

Gewinnung von Mediatoren
aus Zellkulturen zur Stimulierung
der unspezifischen Infektabwehr
(Paramunisierung)

Gerhard Reubel

Diss
München

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0089

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr

GEWINNUNG VON MEDIATOREN AUS ZELLKULTUREN
ZUR STIMULIERUNG DER UNSPEZIFISCHEN
INFEKTABWEHR (PARAMUNISIERUNG)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Gerhard Reubel
aus
Roding

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM ÜBER MEDIATOREN	3
2.1. Geschichtlicher Überblick	3
2.2. Begriffsbestimmungen	5
2.3. Antigenspezifische Mediatoren	6
2.4. Nichtantigenspezifische Mediatoren	8
2.4.1. Nomenklatur und Definitionen	8
2.4.2. Wesen und Bedeutung	9
2.4.3. Einteilung, Möglichkeiten der Charakterisierung und biologische Bedeutung in vitro	10
2.4.4. Möglichkeiten der Produktion	24
2.4.5. Biologische Bedeutung in vivo	30
2.4.5.1. Endogene Aktivität von Mediatoren	30
2.4.5.2. Wirkung von exogenen Mediatoren	30
2.4.5.3. Antikörper gegen Mediatoren	33
2.5. Ausblick	35
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1. MATERIAL UND METHODEN	37
3.1.1. Verwendete Zellkulturen	37
3.1.1.1. Zellkulturen aus Organen	37
3.1.1.2. Permanente Zell-Linien	37
3.1.1.3. Hybridoma-Zellen	38
3.1.2. Zur Zellstimulierung verwendete Substanzen	40
3.1.3. Technischer Ablauf der Mediatorengewinnung	42
3.1.3.1. Zelldichte	42
3.1.3.2. Zellstimulation	42
3.1.3.3. Inkubationsdauer	43

	Seite
3.1.3.4. Ernteverfahren	43
3.1.3.5. Weitere Behandlung	44
3.1.3.6. Inducervirus-Entfernung	45
3.1.3.7. Lagerung	45
3.1.3.8. Placebos	50
3.1.4. Serologische Untersuchungen	51
3.1.5. In vivo - Untersuchungen zum Nachweis einer Mediatorenwirkung	52
3.1.5.1. Infektionsbelastungsmodell " Babymaus " / Vesicularis Stomatitis Virus (VSV)	52
3.1.5.2. Infektionsbelastungsmodell Adulte Maus / Aujeszky Virus (AV)	56
3.1.6. In vitro - Teste zum Nachweis spezifischer Mediatorenwirkungen	58
3.1.6.1. Untersuchung der Stimulierbarkeit von Lymphozyten über Messung des Einbaus von (U- ¹⁴ C)- Thymidin in ihre DNA	58
3.1.6.2. Untersuchung über die Stimulier- barkeit der Phagozytose mittels eines Latex-Inkorporationstests	62
3.1.6.3. Untersuchung über die Stimulier- barkeit der natürlichen (sponta- nen) zellvermittelten Zytotoxizi- tät mittels eines ⁵¹ Cr-Freisetzungs- tests	63
3.1.6.4. Untersuchung der Induzierbarkeit von Interferon über direkten und indirekten Interferonnachweis durch den VSV-Plaque-Reduktions- test	65
3.2. ERGEBNISSE	68
3.2.1. Eignung der verschiedenen Zellkulturen für die Gewinnung nichtantigenspezifischer Mediatoren	68
3.2.2. Eignung der untersuchten Substanzen für die Stimulierung der Zellkulturen	68

	Seite
3.2.3. Untersuchung über die homologe Wirksamkeit der Mediatoren in vivo	69
3.2.3.1. Infektionsbelastungsmodell " Babymaus " / VSV	69
3.2.3.2. Infektionsbelastungsmodell Adulte Maus / AV	72
3.2.3.3. Spezielle Untersuchungen mit Zellkulturüberständen und Placebos	76
3.2.4 Untersuchungen über die homologe und heterologe Wirksamkeit der Mediatoren in vitro	85
3.2.4.1. Lymphozytenstimulation	85
3.2.4.2. Phagozytose	90
3.2.4.3. Natürliche (spontane) Zyto-toxizität	93
3.2.4.4. Interferon-Induktion	95
3.2.5. Nachweis der Mediatorenwirkung als Ursache der hervorgerufenen biologischen Effekte	98
3.2.5.1. Ausschluß einer Antikörperwirkung als Infektionsschutz	98
3.2.5.2. Überprüfung von Einzelkomponenten bei der ZKÜ-Herstellung als Wirksubstanz	98
3.2.5.3. Ausschluß der Stimulators substanz PIND-ORF als Wirksubstanz	99
4. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E	100
5. Z U S A M M E N F A S S U N G	108
S U M M A R Y	109
6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	110
7. A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S	140
L E B E N S L A U F	144

1. EINLEITUNG

Die Zunahme der infektiösen Faktorenkrankheiten und Mischinfektionen speziell in der Massentierhaltung zwingt die Tiermedizin, neue Wege in Prophylaxe und Therapie zu gehen.

Aus dieser Notwendigkeit heraus hat sich ein neuer Zweig der Infektionsmedizin entwickelt, der sich vor allem mit der medikamentösen Steigerung der nicht-antigenspezifischen körpereigenen Abwehr befaßt, für die von MAYR der Begriff der PARAMUNITÄT geprägt wurde (137, 138, 139, 142, 143).

Durch Nutzung der paraspezifischen Wirkung bestimmter viraler und bakterieller Impfstoffe entwickelte MAYR sogenannte Paramunitätsinducer (PIND), die eine Vielzahl von Mechanismen der nichterregerspezifischen Abwehr stimulieren können und daher als multipotente Inducer (Inducer Typ I) bezeichnet werden (142).

Als funktionelle Grundlagen einer Paramunität konnten unter anderem nachgewiesen werden (142):

Stimulierung der Lymphozytenproliferation bzw.-aktivität, Induktion von endogenem Interferon, Aktivierung der " natural killer cells " (spontane zellvermittelte Zytotoxizität), Steigerung der Mikro- und Makrophagentätigkeit mit verstärkter Abgabe von Mediatoren, Aktivierung humoraler, nichterregerspezifischer Abwehrfaktoren, und nicht zuletzt Freisetzung bzw. erhöhte Reaktivität von Lymphokinen und anderen Mediatoren bzw. Aktivatoren.

All diese Mechanismen einer unspezifischen Infektabwehr beziehen in ihre Wirkungsweise so unterschiedliche zelluläre und humorale Abwehrfaktoren mit ein, daß eine Kooperation und Regulation zwischen den einzelnen Effektorzellsystemen existieren muß.

In den letzten Jahren sind immer mehr biologische Tatsachen bekannt geworden, wonach die Interaktionen zwischen den verschiedenen Abwehrsystemen durch Informationsträger erfolgen, die lösliche, nicht zelluläre Substanzen sind und allgemein als Mediatoren bezeichnet werden (199).

In der vorliegenden Arbeit wird experimentell untersucht, ob es möglich ist, bestimmte Zellkulturen so zu stimulieren, daß sie nichtantigenspezifische Mediatoren bilden und in das Medium abgeben. Dabei interessieren die Zellarten, welche bevorzugt Mediatoren produzieren, und die Art der Mediatoren, die gebildet werden. Schließlich werden die Mediatoren auf ihre Fähigkeit überprüft, *in vivo*, d.h. in Versuchstieren, bestimmte unspezifische Abwehrmechanismen zu stimulieren, wobei zwischen homologen und heterologen Biosystemen unterschieden wird.

2. S C H R I F T T U M Ü B E R M E D I A T O R E N

2.1. Geschichtlicher Überblick

Auf lösliche Biofaktoren wurde man erstmals 1926 in Überständen von Meerschweinchen-Lymphozytenkulturen aufmerksam (263). 1932 wiesen Rich und Lewis in Überständen von Leukozyten- und Milzzellkulturen tuberkulinsensibilisierter Tiere bei Anwesenheit von Tuberkulin Hemmfaktoren nach, die gegen die Auswanderung von Makrophagen gerichtet waren (193).

Mit der Entwicklung neuer Techniken (18,31,41,68) gelang es in den sechziger Jahren, derartige biologische Phänomene genauer zu erforschen. Unabhängig voneinander fanden 1966 verschiedene Wissenschaftler in Überständen antigenstimulierter Lymphozyten einen löslichen Faktor, der die Wanderungsfähigkeit von Makrophagen beeinträchtigte und den man als Migration inhibitory factor (MIF) bezeichnete (17,40). In der Folgezeit wurden eine Reihe anderer biologischer Aktivitäten in Zellkulturüberständen aktivierter Lymphozyten entdeckt, darunter Faktoren, die auf bestimmte Zielzellen zytotoxisch wirkten (z.B. die Lymphotoxine) (75,206), oder solche, die Leukozyten in ihrer Beweglichkeit hemmten (z.B. der Leukocyte migration inhibitory factor, LIF).

Schließlich schlug 1969 Dumonde vor, als Überbegriff für Mediatoren aus aktivierten Lymphozyten die Bezeichnung LYMPHOKINE zu verwenden (44).

Zwischen 1966 und 1970 erschienen immer häufiger neue Namen für Lymphokine, wobei die Untersuchung von Mediatoraktivitäten bei Entzündungsreaktionen im Vordergrund standen (Beschreibung chemotaktischer Faktoren).

Beachtung schenkte man auch der Tatsache, daß die Immunglobulinbildung durch lösliche Mediatoren beeinflusst werden kann, die die Bezeichnung Helfer- bzw. Suppressor-faktoren erhielten.

Zu Beginn der siebziger Jahre wies man nach, daß auch Makrophagen nach geeigneter Stimulierung lösliche Faktoren abgeben, die man als MONOKINE bezeichnete (8). Cohen et al. wählten 1974 den Begriff CYTOKINE, um lösliche Produkte nicht-lymphatischer Zellen zu definieren, die in ihrer Wirkung den bisher bekannten Lymphokinen sehr ähnlich waren (34).

Alle neu entdeckten Mediatoren wurden aufgrund ihrer Effekte in verschiedenen in vitro- und in vivo-Testsystemen beschrieben und benannt. Die biochemische Charakterisierung ist bei der Mehrzahl dieser Faktoren noch nicht so weit fortgeschritten, daß auf molekularer Ebene eine Abgrenzung einzelner Mediatoren voneinander möglich wäre. Es besteht daher die Wahrscheinlichkeit, daß verschiedene biologische Wirkungen von ein und derselben Substanz verursacht werden (222).

Im folgenden wird versucht, die Begriffe Lymphokine, Mediatoren bzw. Faktoren so gut wie möglich zu definieren, ihre biologische Bedeutung aufzuzeigen und sie zu klassifizieren.

2.2. Begriffsbestimmungen

Für die Vielzahl der inzwischen nachgewiesenen, löslichen Biosubstanzen gibt es eine Menge von Begriffen, die sich teilweise überschneiden bzw. synonym verwendet werden. Als Überbegriff benutzt man häufig auch den Ausdruck "Faktor".

Zunächst ist es notwendig, zwischen "antigenspezifischen" und "nichtantigenspezifischen" Mediatoren zu unterscheiden.

Unter antigenspezifischen Mediatoren versteht man körpereigene oder in Zellkulturen hergestellte biologische Stoffe, deren Produktion und Sekretion durch ein bestimmtes Antigen ausgelöst wird, und deren Wirkung sich nur gegen dieses Antigen richtet.

Nichtantigenspezifische Mediatoren sind Naturstoffe, deren Produktion und Abgabe sowohl spontan ablaufen, als auch durch Antigen- oder Mitogenstimulation ausgelöst werden können, wobei aber die sezernierten Substanzen nicht nur eine Wirkung gegen das auslösende Antigen induzieren, sondern auch eine vielfältige Signalfunktion auf verschiedene Effektorzellen im immunologischen und paramunologischen Netzwerk ausüben können.

Jedoch ist nicht alles, was ein stimulierter Lymphozyt produziert, ein Lymphokin im Sinne eines nichtantigenspezifischen Mediators.

Keinesfalls kann man die antigen- oder mitogeninduzierten Eiweißkörper wie Immunglobuline (z.B. IgM-, IgA-, IgG-Antikörper oder Thyroid-stimulierendes Immunglobulin) zu solchen Mediatoren zählen (113). Fraglich bleibt auch die Zuordnung gut bekannter Gewebshormone wie z.B. Prostaglandine (56) oder Leukotriene (210), die u.U. ebenfalls von Lymphozyten gebildet werden können.

Die Grenze zwischen Lymphokinen, Monokinen, Cytokinen und anderen biologisch aktiven Faktoren festzulegen, ist durch das Fehlen einer einheitlichen, genauen Mediator-Definition nach wie vor häufig dem persönlichen Ermessen der Wissenschaftler überlassen.

2.3 Antigenspezifische Mediatoren

Wesen und Bedeutung

Bei antigenspezifischen Mediatoren handelt es sich um lösliche Produkte vor allem von Subpopulationen der T-Zellreihe. Die größte Bedeutung besitzen die T-Suppressorzellen (SC) bzw. die T-Helferzellen (HC), aber auch aus T-Effektorzellen sind antigenspezifische Mediatoren bekannt.

Die Helferfaktoren (HF) werden nach Antigenstimulation sezerniert und induzieren bei B-Zellen die Bildung von Immunglobulinen, die gegen das auslösende Antigen gerichtet sind. Suppressorfaktoren (SF) unterdrücken nach Antigenstimulation die Antikörperproduktion (229).

Der Transferfaktor (TF) stellt eine von Lymphozyten nach Antigensensibilisierung sezernierte Substanz dar, durch die die Sensibilität gegen das auslösende Antigen zellfrei auf einen Empfänger übertragen werden kann, und von diesem auf einen zweiten und dritten (151).

Der Specific macrophage arming factor (SMAF) ist ein Mediator, der von Lymphozyten sezerniert wird, die gegen bestimmte Tumorzellen sensibilisiert wurden, und der Makrophagen zur Zytotoxizität nur gegen diese Tumorzellen aktiviert (126).

Einen Überblick über die erwähnten antigenspezifischen Mediatoren gibt Tabelle 1.

Tabelle 1 : Übersicht über antigenspezifische Mediatoren

Bezeichnung	Biologische Wirkung	Referenz
Helper factors (H F)	Stimulierung der Immunglobulin-Bildung	229
" IgT "		54, 217
specific T cell helper factor		231
Suppressor factors (S F)	Supprimierung der Immunglobulin-Bildung	114, 229
Specific T cell suppressor factor		6
Allotype suppression factor		105
Transfer factor (T F)	zellfreie Übertragung von Sensibilität gegen ein bestimmtes Antigen	55, 151
Specific macrophage arming factor (S M A F)	Induktion der spezifischen Zytotoxizität von Makrophagen gegen bestimmte Tumorzellen	126

2.4. Nichtantigenspezifische Mediatoren

2.4.1. Nomenklatur und Definitionen

Der am häufigsten gebrauchte Ausdruck ist die seit 1969 in der Literatur verwendete Bezeichnung LYMPHOKINE (44), für die Bundschuh und Schneeweiß folgende Definition geben: " Von Lymphozyten nach spezifischer und unspezifischer Aktivierung gebildete und freigesetzte lösliche Faktoren, die auf unterschiedlichste Zellsysteme wirken und so zur Verstärkung der Abwehrleistung eines Organismus gegenüber Antigenen verschiedenster Art führen. " (26). Gleichbedeutend mit Lymphokin werden die Bezeichnungen MEDIATOR (55) und Faktor (26) benutzt.

Als synonyme Begriffe für nichtantigenspezifische Mediatoren erscheinen im Schrifttum weiterhin folgende Ausdrücke: Lymphozyten-Mediator, Lymphozyten-Aktivierungsprodukt, lösliches Lymphozytenprodukt, Mediator zellulärer Immunität (26), löslicher Mediator immunologischer Regulierung (236), Immunmodulator (168,234), u.a.m..

Diese manchmal verwirrende Vielzahl von Ausdrücken wird noch durch die beiden Begriffe MONOKINE und CYTOKINE erweitert, wobei mit Monokinen Substanzen bezeichnet werden, die von mononukleären Zellen (Makrophagen, Monozyten) abgegeben werden. Cytokine sind Mediatoren, die spontan, oder z.B. nach Virusinfektionen von nicht-lymphoiden Zellen sezerniert werden.

Cohen und Mitarbeiter (34) schlugen vor, den Begriff Cytokine für alle löslichen Substanzen zu verwenden, die sowohl von lymphoiden als auch von nicht-lymphoiden Zellen gebildet werden, wenn sie auf Zielzellen dieselben Wirkungen ausüben könnten wie die "klassischen" Lymphokine.

Demnach stellen die Lymphokine und Monokine in der weiten Gruppe der Cytokine spezielle Substanzgruppen dar, die durch die Tatsache definiert sind, daß sie von Lymphozyten bzw. mononukleären Zellen abgegeben werden, und im allgemeinen als Antwort auf eine Antigen- oder Mitogenstimulation entstehen.

2.4.2. Wesen und Bedeutung

Nichtantigenspezifische Mediatoren sind lösliche Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 10 000 und 100 000 Dalton, die für relativ kurze Zeitintervalle von unterschiedlichen Zellarten verschiedenster Spezies in vitro und in vivo gebildet werden, wobei die Sekretion spontan ablaufen oder durch Reize (Antigene, Mitogene, Toxine u.a.m.) ausgelöst werden kann.

Mediatoren sind keine Immunglobuline und zeigen auch keine strukturellen Ähnlichkeiten mit ihnen. Daß sie keine präformierten Bestandteile von Zellen sind, sondern erst nach Reiz synthetisiert und abgegeben werden, unterscheidet sie auch grundsätzlich von den Mediatoren der Anaphylaxie und von Enzymen phagozytierender Zellen, die in Form von Granula in der Zelle schon gestapelt vorliegen, und lediglich als Folge eines Reizzustandes abgegeben werden (184).

Seit Beginn der siebziger Jahre befaßt sich eine immer größere Zahl von Wissenschaftlern mit diesen Mediatoren. So ist es durch differenziertere Methoden gelungen, die Funktionen der an den Abwehr- und Immunreaktionen des Organismus beteiligten Zellen immer genauer zu untersuchen und bisher nicht bekannte Subpopulationen von lymphatischen Zellen zu entdecken.

Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, daß das Zusammenwirken der verschiedenen Zellpopulationen durch

lösliche Produkte beeinflusst wird, die als informative Trägersubstanzen fungieren, mehrstufige Folgereaktionen auslösen können und dadurch eine regulative Funktion vor allem in der zellulären Abwehr einnehmen (245); sie scheinen aber auch Querverbindungen zu humoralen Abwehrmechanismen herzustellen, und - wie in jüngster Zeit vermutet wird (13,14) - zum neuro-endokrinen System.

2.4.3. Einteilung, Möglichkeiten der Charakterisierung und biologische Bedeutung in vitro

Zur Klassifizierung der Vielzahl von neu entdeckten Mediatoren bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Die Schwierigkeit, eine allgemein gültige Einteilung vorzunehmen, besteht vor allem darin, daß eine genaue chemische und molekulare Charakterisierung der Mediatoren zunächst nicht vorlag. Dadurch war man gezwungen, sie nach anderen Kriterien einzuordnen. Darüberhinaus ist es auch schwierig, biologische Effekte bestimmten Mediatoren zuzuordnen, weil eine stimulierte Zelle gleichzeitig eine ganze Reihe unterschiedlicher Mediatoren produzieren kann, und diese wiederum eine Vielfalt biologischer Reaktionen stimulieren. Da die unterschiedliche Wirkung eventuell auch von der Konzentration der Mediatoren abhängt, bzw. auf verschiedene Molekülgruppen des gleichen Proteins zurückzuführen sein könnte, kam es auch vor, daß verschiedene Namen für ein und denselben Mediator verwendet wurden. Dies führte teilweise zu Unklarheiten in der Nomenklatur und Klassifizierung von Mediatoren.

Pick schlug z.B. eine funktionelle Einteilung in hemmende, stimulierende und die Entzündung beeinflussende Faktoren vor (183).

Rocklin et al. gingen bei ihrer Einteilung von der

Wirkung der Mediatoren auf bestimmte Zielzellen aus und klassifizierten sie z.B. als Makrophagen-, Lymphozyten- oder andere Zellen beeinflussende Faktoren (199). Eine Möglichkeit für eine übergreifende Einteilung ist die Definierung der Mediatoren nach ihrer Zellherkunft (Effektorzellen). So wurden die Begriffe Cytokine (34) für Produkte nicht-lympoider Zellen, Lymphokine (44) für Sekrete von Lymphozyten, und Monokine (8) für Mediatoren von Makrophagen gewählt.

Durch Verfeinerung der Methoden hat man in den letzten Jahren auch die chemisch-physikalische Charakterisierung herangezogen, wobei man zur Bestimmung der Eigenschaften u.a. folgende Verfahren und Parameter untersuchte:

Molekulargewicht, Stabilität nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen (z.B. Chymotrypsin, Trypsin, Neuraminidase), Stabilität bei verschiedenen pH-Werten oder bei unterschiedlichen Temperaturen (z.B. 56°C, 80°C); weiterhin kommen zur chemisch-physikalischen Differenzierung hinzu: Isoelektrischer Punkt, Dichte-Gradient, Fällbarkeit durch bestimmte Salze (z.B. Ammoniumsulfat) u.ä.m. (243).

Die Differenzierung der einzelnen Mediatoren, bzw. die Zuordnung der biologischen Effekte ist inzwischen durch neue biologische Testverfahren, z.B. durch Anwendung von Antilymphokinserum (ALKS) (199) und monoklonalen Antikörpern (25) weiter verbessert worden.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand scheint eine Einteilung nach dem zellulären Ursprung der Mediatoren (Effektorzellen) und ihrer biologischen Wirkung auf bestimmte Zielzellen am sinnvollsten.

In den Tabellen 2-7 wurde versucht, die Vielzahl der bisher beschriebenen Mediatoren nach diesen Kriterien zu ordnen.

Die Abbildung 1 gibt grobschematisch die Biofunktion verschiedener Mediatoren im komplexen Abwehrsystem wieder.

Tabelle 2 : Übersicht über Mediatoren, die Makrophagenfunktionen beeinflussen

Bezeichnung	Abkürzung	zell.Ursprung	Referenz
Migration inhibitory factor	M I F	LK*, CK**	41, 185
Macrophage activating factor	M A F	LK, CL****	48, 111, 144
Macrophage aggregating factor	M Ag F	LK	127, 189
Macrophage chemotactic factor	M C F	LK, CK, CL	3, 239
Macrophage enhancement factor	M E F	LK	248
Migration stimulation factor	M St F	LK	1
Monocyte complement stimulator	M C S	LK	124
Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor	G M - C S F	LK, CK, MK***	30, 147
Macrophage growth factor-colony stimulating factor	M G F - C S F	LK	207
Interferon alpha, beta	I F N α, β	LK, CK, CL	112, 215

* LK = Lymphokin (Produkt von Lymphozyten)

** CK = Cytokin (Produkt von nicht-lymphatischen Zellen)

*** MK = Monokin (Produkt von mononukleären Zellen)

**** CL = Cell line (Produkt von etablierten Zell-Linien)

Tabelle 3a : Übersicht über Mediatoren, die Lymphozytenfunktionen beeinflussen

Bezeichnung	Abkürzung	Synonyme	Bezeichnungen	Zell.Ursprung	Referenz
Interleukin 1	I L 1	Lymphocyte activating factor T cell replacing factor B cell activating factor	(LAF) (TRF) (BAF)	MK, CL	20,117,148 165,97 253
Interleukin 2	I L 2	T cell growth factor Thymocyte mitogenic factor Thymocyte stimulating factor	(TCGF) (TMF) (TSF)	LK, CL	69,70,204 250,52 28
Interleukin 3	I L 3	-	-	LK, CL	103,104
Lymphocyte mitogenic factor	L M F	Lymphocyte blastogenic factor Lymphocyte potentiating factor	-	LK, CL	62,199 106
Lymphocyte chemotactic factor	L C F	-	-	LK	3,242
Epidermal cell thymocyte activating factor	E T A F	-	-	CK	130
Lymphocyte colony inhibitory factor	L C I F	-	-	MK	203

Tabelle 3b : Übersicht über Mediatoren, die Lymphozytenfunktionen beeinflussen

Bezeichnung	Abkürzung	Synonyme	Bezeichnungen	Zell.Ursprung	Referenz
Lymphocyte colony promoting factor	L C P F	-		MK	203
Lymphocyte colony enhancing factor	L C E F	-		LK	203
Helper factors:					
Nonspecific mediators	H F	-		LK	199
Soluble enhancing factor	N S M	-		LK	49
Allogeneic effect factor	S E F	-		LK	204
	A E F	-		LK	5
Suppressor factors:					
Antibody inhibitory material	S F	-		LK	199
Soluble immune response suppr. f.	A I M	-		LK	4
Antibody initiation suppr. f.	S I R S	-		LK	194
Macrophage dialyzable factor	A I S F	-		LK	43
Low molecular weight suppressor	M D F	-		MK	238
	L M W S	-		MK	128
Interferon gamma	I F N- γ	Interferon Typ II (Immune-IFN)		LK	134

Tabelle 4 : Übersicht über Mediatoren, die Leukozytenfunktionen beeinflussen

Bezeichnung	Abkürzung	Zell.-Ursprung	Referenz
Leukocyte migration inhibitory factor (syn.: Polymorphonuclear migration inhibitory factor)	L I F P M N - M I F	LK, CL	85, 98, 197
Basophil chemotactic factor	B C F	LK	241
Basophil chemotaxis augmentation factor	B C A F	LK	120
Neutrophil immobilizing factor	N I F	LK	71
Neutrophil chemotactic factor	N C F	LK	3
Eosinophil chemotactic factor	E C F	LK	33
Eosinophil stimulating promoter	E S P	LK	38
Eosinophil colony stimulating factor	E O - C S F	LK, CL	146
Granulocyte macrophage colony stimulating factor	G M - C S F	LK, CK, MK	147

Tabelle 5 : Übersicht über Mediatoren, die verschiedene Zellarten beeinflussen

Bezeichnung	Abkürzung	zell.Ursprung	Zielzellen (z.B.)	Referenz
Lymphotoxin	L T	LK	Tumorzellen	75,156
Proliferation inhibitory factor	P I F	LK, CL	Lymphozyten	78,156
Cloning inhibitory factor	C I F	LK, MK, CK	Tumorzellen	208
Inhibitory of DNA synthesis	I D S	LK	Lymphozyten	155,157
Mixed leukocyte culture reaction-suppressor factor	M L R - S F	LK	Lymphozyten	195
Colony stimulating factor	C S F	LK, CK, CL	Fibroblasten, Tumorzellen	145
Skin reactive factor	S R F	LK, CL	Blutgefäßendothelien	181,182
Lymph-node permeability factor	L N P F	LK	Blutgefäßendothelien	251
Thymic permeability factor	T P F	LK	Blutgefäßendothelien	131
Vascular permeability factor	V P F	LK	Blutgefäßendothelien	220
Platelet aggregating factor	P A F	LK	Thrombozyten	119
Osteoclast activating factor	O A F	LK, CL	Knochenmarkszellen	99,101
Lymphocyte derived chemotactic factor for fibroblasts	L D C F - F	LK	Fibroblasten	190
Macrophage derived fibroblast activating factor	M D F A F	MK	Fibroblasten	235
Interferon gamma	I F N - γ	LK	NK cells, Cytotoxic T lymphocytes	134

Abbildung 1 : Biofunktionen verschiedener Mediatoren im komplexen Abwehrsystem
(modifiziert nach Hanson et al. (88))

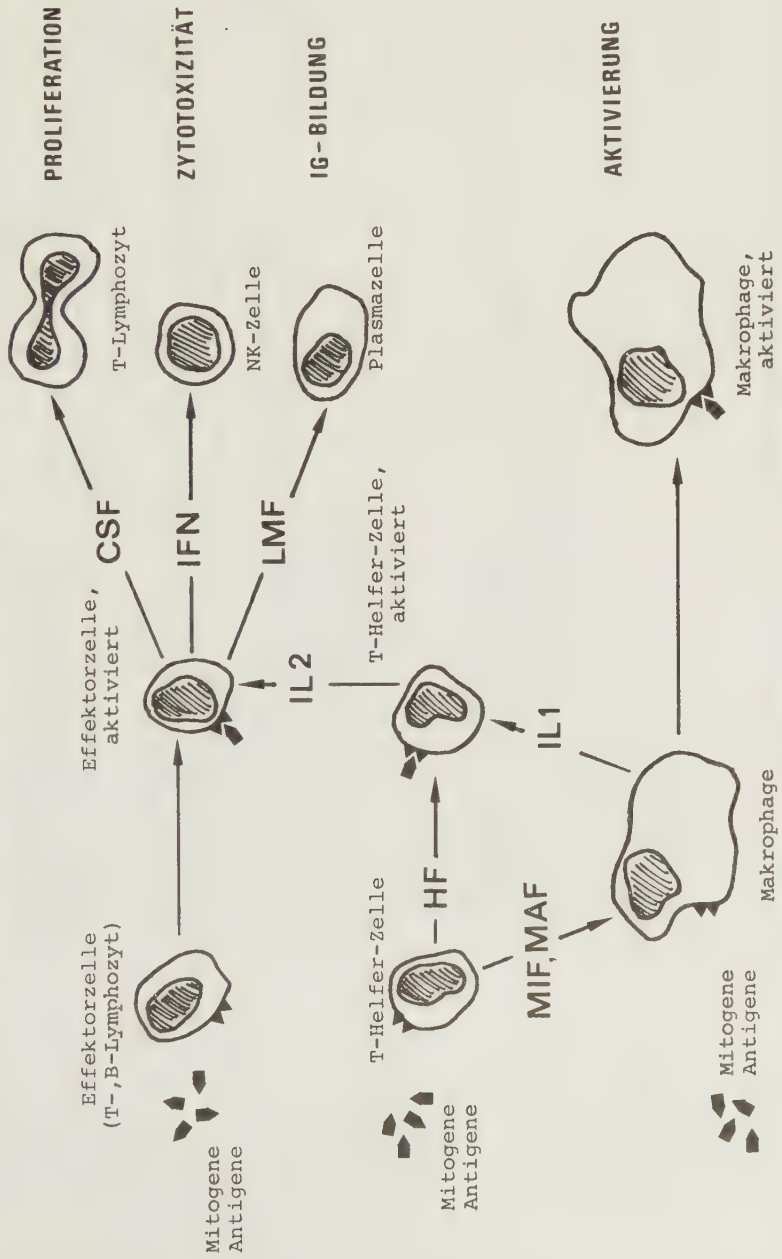


Tabelle 6a : In vitro nachgewiesene biologische Wirkungen verschiedener Mediatoren

Mediator	Biologische Wirkung	Referenz
<u>M I F</u> (identisch mit MAF ?)	• Hemmung der Makrophagenmotilität • Erhöhung der Aggregationsfähigkeit von Makrophagen • Erhöhung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen • Speziesübergreifende Wirkung	185, 199, 211
<u>M A F</u> (identisch mit MIF und/oder IFN ?)	• Aktivierung von Makrophagen, die sich u.a. in folgenden Effekten äußern kann: Erhöhung der Aggregationsfähigkeit von Makrophagen • Erhöhte Phagozytosefähigkeit • Erhöhte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen • Erhöhte antibakterielle und antiparasitäre Eigenschaften • Vermehrte Produktion und Sekretion von lysosomalen Enzymen, Prostaglandinen, Komplementfaktoren, Plasminogenaktivator • Speziesübergreifende Wirkung	23, 144, 211 42 48 186, 187 21 74, 123, 124, 163 196
<u>L I F</u>	• Bewegungshemmung von neutrophilen Granulozyten auf direktem Weg und über Verstärkung durch niedermolekulare chemotaktische Inhibitoren (z.B. NIF) • Speziesübergreifende Wirkung	85, 199

Tabelle 6b : In vitro nachgewiesene biologische Wirkungen verschiedener Mediatoren

Mediator	Biologische Wirkung	Referenz
C F	. Verstärkerfunktion in der Mobilisierung und Aktivierung von Entzündungszellen (Makrophagen, Leukozyten, Lymphozyten)	3
P F	. Beeinflussung der Permeabilität von Blutgefäßendothelzellen	131, 220, 251
H F	. Förderung der Immunglobulinbildung	199
S F	. Supprimierung der Immunglobulinbildung	199
G M - C S F	. Differenzierung der Knochenmarksvorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten zu voll ausgereiften Zellen der monozytären und granulozytären Zellreihe	30, 147
I D S (identisch mit MLR-SF ?)	. Suppression der DNA-Replikation von Lymphozyten . Speziesübergreifende Wirkung	155, 157, 219

Tabelle 6c : In vitro nachgewiesene biologische Wirkungen verschiedener Mediatoren

Mediator	Biologische Wirkung	Referenz
<u>L M F</u>	. allgemein: Verstärkung immunologischer Reaktionen ("amplification" factor)	61,106,169
	. Stimulierung der Lymphozytenproliferation	61
	. Stimulierung der LT-Produktion	
	. Regulation der T-Zell-Reifung	
	. Stimulierung der Immunglobulinbildung	
<u>L T</u>	. Induktion der BCAF-Abgabe durch B-Zellen	
	. Wachstumshemmung und nichtantikörperabhängige Zytotoxizität wahrscheinlich abhängig von der Konzentration des LT, das möglicherweise identisch ist mit PIF (in mittlerer Konzen- tration) und CIF (in niedriger Konzentration), wobei die Konzentration wiederum von der Antigen-oder Mitogen- intensität und der Einwirkungsdauer abhängen könnte (feedback-Mechanismus ?)	62,199 78,208
<u>O A F</u>	. Stimulation von Osteoklasten zur Resorption von fetalem Knochengewebe, erhöhte Aktivität in Knochenmarksgewebe bei multiplen Myelomen	99,100,101

Tabelle 6d : In vitro nachgewiesene biologische Wirkungen verschiedener Mediatoren

Mediator	Biologische Wirkung	Referenz
E T A F (identisch mit IL 1 ?)	. Stimulierung der T-Zell-Proliferation durch Induktion der IL 2 - Sekretion . Speziesübergreifende Wirkung	130
I L 1	. allgemein: Lymphozytenaktivierung . Förderung der Lymphozytendifferenzierung (z.B. zu CTL) . Stimulierung der Proliferation von T-Zellen durch Induktion der IL 2 - Abgabe durch T-Helfer-Zellen . Induktion der Abgabe von anderen Mediatoren (z.B. MIF, IL 2) . Stimulierung der Histamin-induzierten T-Zell-Suppression . Stimulierung der Fibroblasten-Proliferation . Stimulierung der Antikörperantwort über Beeinflussung der T-Helfer-Zellen . Speziesübergreifende Wirkung	20, 117, 148 218 247
I L 2	. Aufrechterhaltung des proliferativen Wachstums von T-Zellen (CTL, HC) in Zellkulturen . Steigerung der Reaktionsfähigkeit von Thymozyten gegenüber Mitogenen	70, 218, 247, 250

Tabelle 6e : In vitro nachgewiesene biologische Wirkungen verschiedener Mediatoren

Mediator	Biologische Wirkung	Referenz
I L 2	- Steigerung der NK-Zell-Aktivität vermutlich über Induktion der Interferon gamma-Produktion - Teilweise spezieübergreifende Wirkung	93, 108, 166 122
I L 3	- Induktion der Bildung von 200$\times$-SDH in Milzzellkulturen - Wachstumsförderung von WEHI-3-Zellen ($\approx$ Aktivität von WEHI-3-growth factor) - Wachstumsförderung von Knochenmarkszellkolonien ($\approx$ CSF-Aktivität) - Förderung der Differenzierung mastzellähnlicher Zellen ($\approx$ Aktivität von Mast cell growth factor (MCGF) bzw. von P cell stimulating factor (PCSF)) - Aktivierung der Histaminsynthese ($\approx$ Aktivität von Histamin producing cell stimulating factor (HPCSF))	103, 104

Tabelle 7 : Übersicht über biologische Eigenschaften von Interferonen (IFN)

Bezeichnung	Aktivierung z.B. durch	Biologische Wirkung	Referenz
I F N alpha (Leukozyten-IFN, IFN Typ I) pH 2 stabil Zell-Ursprung: Leukozyten, Lymphozyten (v.a. B-Zellen)	Viren, Mykoplasmen, Bakterien Synthetische Inducer, Tumorzellen	• Antiviraler Effekt • Inhibierung der Tumorzellteilung • Aktivierung/Suppression der AK-Bildung abhängig von der Konzentration und vom Zeitpunkt der Anwendung • Stimulierung der DTH durch Inhibierung der T-Suppressor-Zellen • Erhöhung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen in vitro und in vivo • Erhöhung der Synthese von Prostaglandin und Plasminogenaktivator bei Makrophagen • Erhöhung der IgE-vermittelten Histaminabgabe durch basophile Leukozyten • Steigerung der spezifischen Zytotoxizität von T-Zellen	2, 24, 84, 133, 164
I F N beta (Fibroblasten-IFN, IFN Typ I) pH 2 stabil Zell-Ursprung: v.a. Fibroblasten	v.a. Viren	• Erhöhung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen in vitro und in vivo • Erhöhung der Synthese von Prostaglandin und Plasminogenaktivator bei Makrophagen • Erhöhung der IgE-vermittelten Histaminabgabe durch basophile Leukozyten • Steigerung der spezifischen Zytotoxizität von T-Zellen	80, 102 81, 107
I F N gamma (Immun-IFN, IFN Typ II) pH 2 labil Zell-Ursprung: Lymphozyten (v.a. T-Zellen), Monozyten	Mitogene, Antigene (viral, bakteriell, zellulär)	• Steigerung der spontanen Zytotoxizität (NK-Zell-Aktivität) in vitro und in vivo • relativ speziessübergreifende Wirkung • gemeinsam mit IFN-α und IFN-β auf, zusätzlich sind aber folgende wichtige Eigenschaften zu nennen: • Starke antitumorale Wirkung durch Hemmung der Zellteilung • starke Steigerung der NK-Zell-Aktivität • Aktivierung/Supprimierung der AK-Bildung • relativ speziesspezifische Wirkung	93, 108 2 227 134, 208

2.4.4. Möglichkeiten der Produktion

Alle Mediatoren stammen aus Effektorzellen (vergl.vorher). Nachfolgend wird ein Überblick über die Zelltypen gegeben, die Mediatoren zu produzieren vermögen, und über die Stimulierungssubstanzen, die für eine Bildung und Abgabe von Mediatoren geeignet sind (Tabellen 8-11).

Grundsätzlich ist zur Bildung der meisten bis jetzt beschriebenen Mediatoren eine auslösende Substanz nötig (z.B. ein Antigen oder Mitogen), für die Produktion das Zusammenwirken von B- und T-Lymphozyten Voraussetzung und fast durchwegs die Anwesenheit von Makrophagen erforderlich, wobei diese entweder über Abgabe löslicher Mediatoren in das Stimulationsgeschehen eingreifen oder über die "Präsentation" des Antigens in löslicher Form (202). Die letzte Voraussetzung muß nicht unbedingt erfüllt werden für den Mitogenic factor, Interleukin 3 und den Colony stimulating factor, die auch ohne Makrophagenpräsenz gebildet werden können (103,202).

Physikalisch-chemische Unterschiede zwischen Mediatoren, die von verschiedenen Zelltypen (T-,B-Lymphozyten, lymphoide und nicht-lymphoide Zell-Linien) gebildet werden, konnten in den bisherigen Untersuchungen nicht gefunden werden (115,256).

Aktivierungssubstanzen

Die zur Auslösung einer Mediatorproduktion verwendeten Aktivierungssubstanzen können in zwei große Gruppen eingeteilt werden:

1. Mitogene

Dabei handelt es sich vor allem um pflanzliche Lektine, z.B. Phytohemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Pokeweed mitogen (PWM) und um bakterielle Zellbestandteile oder Toxine: z.B. Lipopolysaccharid von *Salmonella typhosa* (LPS), gereinigte Tuberkulin-Bestandteile (Purified protein derivative, PPD), Staphylokokken-Enterotoxin B oder Tetanus-Toxoid (TT) (39).

2. Antigenhaltige Substanzen

Verwendet wurden u.a. Viren (z.B. Sendai-Virus (250) oder Simian Virus 40) (15), Pilze (z.B. *Candida albicans*) (198), Parasiten (z.B. *Schistosoma mansoni*) (77), Fremdzellbestandteile (allogeneic cells) (125), Antigen-Antikörperkomplexe (z.B. mit bovinem Gammaglobulin) (162, 207), Bestandteile von Komplementfaktoren (z.B. C3b, C5a) (115), und die verschiedensten Chemikalien und synthetischen Substanzen (z.B. Phorbol ester, PMA, Dextransulfat (82), DMSO, Poly-IC (205) u.a.m.) (199).

Ein Teil dieser Substanzen stimuliert vor allem T-Lymphozyten zur Mediatorproduktion (z.B. Con A oder PHA), der andere vermehrt B-Lymphozyten (z.B. LPS oder PPD).

Tabelle 8 : Übersicht über zellulären Ursprung und Aktivierungs-
möglichkeit verschiedener L Y M P H O K I N E

T-Zell- Ursprung	Aktivierung z.B. durch	Lit.	B-Zell- Ursprung	Aktivierung z.B. durch	Lit.
M I F	PPD,TT Dengue-Virus Con A	9 154 37	M I F	LPS,PPD C.albicans	256 198
M A F	Con A Fremdzellen	21 125	M A F	LPS	252
M C F	Con A,PHA	132	M C F	LPS C3b	132 115
GM-CSF	Mitogene	177	C S F	LPS	177
I L 2	Con A PHA Sendai-Virus	115 246 250	-		
I L 3	Con A	104	-		
L M F	Con A TT	59 67	-		
L I F	PHA,PPD	85	L I F	IG-Komplex	162
N I F	spontan	249	-		
H F	Con A,Antigene	199	-		
S F	Con A,Antigene	199	-		
O A F	PHA	100	O A F	PHA	29
L T	PHA	216	L T	PPD	19
B C A F	Antigene	120	-		
E S P	S.mansoni	77	-		
I D S	Antigene, Mitogene	158	-		
M C S	SK-SD	124	-		
I F N	PHA,PWM,HSV,SV, 2 Poly-IC		I F N	PHA,PWM SpA,CP, Tumorzellen	51 2

Tabelle 9 : Übersicht über Aktivierungsmöglichkeit
verschiedener M O N O K I N E

Mediator	Aktivierung z.B. durch	Lit.
I L 1	LPS, PHA C5a	20 73
G M - C S F	spontan LPS, PMA	150 192
L C I F	spontan	203
L C P F	spontan	203

Tabelle 10 : Übersicht über Mediatoren verschiedener mono-
zytärer Zell-Linien und T-Zell-Hybridomas

Mediator	Monozyten/ Makrophagen-Linie	Hybridomas
I L 1	P 388 D ₁ (148) AMo1, (117) AMML	-
I L 2	-	BW 5147 C3H (179) TH 14.83 (180) Hybridoma 123 (213)
GM-CSF	PU 5-1.8 (192)	Hybridoma 123 (213)
M A F	-	Clone 24/G1 (214) M 24/44 (228) E 10-20 (96)
M I F	-	E 10-20 (96)

Tabelle 11 : Übersicht über Mediatoren verschiedener
T- und B-Zell-Linien

Mediator	T-Zell-Linie	Lit.	B-Zell-Linie	Lit.
I L 2	LBRM 33-5A4 JURKAT FHCRC EL 4	149 244 53	-	
I L 3	WEHI-3	103	-	
M I F	Acute lymphatic leukemia (ALL): MOLT 4 B, CCRFL-HSB	261	RPMI 7460 F 9237 Burkitt Lymphom (BL): RAJI Infect.mononucleosis: PGLC 33 H	58 76 58 173
C S F	LBRM 33-5A4 PC-AKR-C	149 109	-	
E O - C S F	WEHI-3	145	-	
O A F	ALL: MOLT	153	IQ, Myeloma: 8226, BL: P ₃ HR 1	153
P I F	MOLT-4 leukemic T	87	Lymphoblastoid Lymphoma	79 95
M A F	PC-AKR-C 129	109	-	
N C F	MOLT 4B, CCRFL-HSB	261	RPMI 1788 und 8392	109
M F	ALL: MOLT 4F, HPB	212	Lymphoma: B 46-M, U 698-M	212
L I F	1301, JM	7	BL: RAJI, DAUDI	7
S R F	-		RPMI 1788	27
L T	-		Morbus Hodgkin: E 6666, DEP 1048	76
I F N	PC-AKR-C 129 Mo	109 159	Burkitt Lymphom Acute myelotic leukemia (AML):8866	91 87

Tabelle 12 : Übersicht über Mediatoren verschiedener nicht-lymphoider Zellarten
(C Y T O K I N E)

Zellulärer Ursprung	Aktivierungssubstanz	Mediator	Lit.
HeLa-Zellen (hum.Cervix-Carcinom)	keine, Spontansekretion	MIF	171,188
Humane Fibroblasten (WI-38)	keine, Spontansekretion	MIF	15,172
Humane Fibroblasten (WI-38)	Simian virus 40	MIF	15,232
Hühner-Embryo-Zellen	Newcastle disease virus Mumps virus	MCF,NCF,IFN MCF,NCF	240
Affennierenzellen (AGKM) (African green monkey kidney)	Mumps virus Newcastle disease virus Simian virus 40	MIF,MCF,NCF MIF MIF	16,57
Parotis-Zellen (Rhesus-Affe)	Mumps virus	MIF	258
Mäuse-Fibroblasten (3T3)	Simian virus 40	MIF	86
Hamster-Fibroblasten (BHK)	Polyoma virus Rous sarcoma virus	MIF MIF	188
Keratinocyten-Zell-Linie (PAM 212)	keine, Spontansekretion	ETAF	130

2.4.5. Biologische Wirkung in vivo

2.4.5.1. Endogene Aktivität von Mediatoren

Nachdem geeignete Nachweismethoden für bestimmte Mediatoren in vitro entwickelt worden waren, versuchte man, ihre physiologische und pathophysiologische Bedeutung auch in vivo zu erforschen (116).

Erhöhte Aktivität des Migration inhibitory factor (MIF) fand man nicht nur im Serum antigensensibilisierter Tiere (254), sondern auch bei Patienten mit diversen lymphoproliferativen Krankheiten, etwa bei Morbus Hodgkin, chronisch lymphozytären Leukämien (z.B. dem Sezary-Syndrom) (260), oder bei bestimmten Myelomen (35).

Durchwegs höhere Aktivitäten verschiedener Mediatoren (MIF, MAF) traten bei rheumatoiden Arthritiden des Menschen oder bei experimentell induzierten Gelenkentzündungen bei Kaninchen auf (224,225,226).

Auf Hautreaktionen vom verzögerten Typ (Delayed type hypersensitivity, DTH) scheint in vivo eine Reihe von Mediatoren regulativen Einfluß zu haben, v.a. der Makrophagen-Aktivierungsfaktor (MAF), der Skin reactive factor (SRF), sowie verschiedene Suppressor- und chemotaktische Faktoren (36,89,262).

2.4.5.2. Wirkung von exogenen Mediatoren

Je besser die Darstellung und Reinigung einzelner Mediatoren gelang, desto häufiger wurden Lymphokine in Zellkulturen hergestellt und iatrogen verabreicht, um ihre Wirkung und biologischen Effekte auch im lebenden Organismus zu untersuchen (72).

Subcutane Verabreichung MIF-haltiger Zellkulturüberstände (ZKÜ) riefen in erster Linie Entzündungs-

reaktionen vom verzögerten Typ hervor, wobei häufig zu einem großen Teil eosinophile Leukozyten unter den Entzündungszellen zu finden waren (10,33,181,182,255). Eine Reaktion auf die intraperitonäale Applikation von Mediatoren (v.a. MIF) ist die Abnahme der Makrophagenzahl in der Peritonäalflüssigkeit (bzw. eine Monozytopenie bei intravenöser Verabreichung), die verschiedene Autoren als Macrophage disappearance reaction (MDR) bezeichneten (160,161,257). Die Ursache dafür ist eine zunehmende Aggregationsfähigkeit der Makrophagen; so scheint die MDR ein in vivo analoger Vorgang zur Migrationshemmung in vitro zu sein (221). Wichtige praktische Bedeutung könnte die Tatsache erlangen, daß sich die Aktivität von Natural killer-Zellen durch Interleukin 2 nicht nur in vitro erhöhen läßt (92), sondern auch nach intraperitonäaler Applikation signifikant ansteigt (90), wobei wahrscheinlich Interferon-gamma als weiterer Mediator zwischengeschaltet ist (108). Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) unterstreichen die regulative Bedeutung von Interleukin 2 für zytotoxische Abwehrmechanismen des Organismus (NK-Zell-Aktivität, spezifische Zytotoxizität gegen Virus-infizierte Zellen) (201).

Mit zunehmendem Wissen über die physiologische Bedeutung von Mediatoren in vivo versuchte man auch, ihre potentiell immunmodulierende Wirkung therapeutisch zu nützen (200).

Im Vordergrund mittlerweile zahlreicher klinischer Untersuchungen stand bisher der Einsatz von Mediatoren bei Tumorerkrankungen des Menschen. Vereinzelt wurde aber auch in Infektionsversuchen bei Tieren die klinische Wirkung von Mediatoren geprüft.

Durch Applikation meist von Mediatorengemischen (MIF, IFN, LT) konnte z.B. die Tumorangehrate übertragbarer

Hepatome fast vollständig reduziert werden (12), Hautläsionen bei bestimmten Tumoren wurden günstig beeinflusst (135), und auch das Wachstum verschiedener Tumoren (z.B. Sarkome) durch intratumorale Injektion gestoppt oder sogar eine Tumorrückbildung erreicht (175,176,208), wobei bestimmte Mediatoren (z.B. LT) spezieübergreifende Wirkungen aufzuweisen scheinen (110).

Im Mittelpunkt der Untersuchungen von Dumonde et al. standen die hormonellen, hämatologischen und biochemischen Veränderungen des Organismus nach einer Applikation von Lymphokinen aus humanen Lymphoidzell-Linien (LCL-LK) (233). Fieber und Lymphopenie als Folge einer starken Erhöhung des Plasma-Cortisolspiegels wiesen darauf hin, daß Lymphokine als Mediatoren immuno-neuroendokriner Interaktionen wirken könnten, und zwar mit direktem oder indirektem Einfluß auf den Hypothalamus (45,46,47,191).

So weisen Mediatoren tatsächlich viele Attribute von Hormonen auf und scheinen in der Zell- und Gewebsphysiologie in Schritten zu agieren, die den klassischen Hormonen sehr ähnlich sind (83).

Die genaue Wirkungsweise der Mediatoren bei der Hemmung des Tumorstwachstums ist bis jetzt nicht bekannt. Möglicherweise beruht sie auf einer Anhäufung von Makrophagen und nachfolgend auf deren Aktivierung zur Tumorzellzerstörung. Nach Meinung von Cohen et al. könnte aber auch eine Bewegungshemmung der Tumorzellen ein Grund für die antitumorale Wirkung bestimmter Mediatoren sein, was z.B. die geringere Metastasierung nach Lymphokin-Anwendung verständlich machen würde (32).

Die Wirkung von Mediatoren in vivo läßt sich auch über eine Stimulierung von Makrophagen zu zytotoxischer Aktivität erklären. Die intraperitonäale Anwendung von MAF z.B. senkte nicht nur die Tumorangehrate eines Fibrosarkoms, sondern erhöhte auch die Überlebenszeit von

Mäusen nach einer experimentellen Infektion mit *Salmonella typhimurium* (118)..

Auch der Serumgehalt an bestimmten Mediatoren hat möglicherweise Einfluß auf die Infektabwehr. Das belegt die Tatsache, daß bei Mäusen die Fähigkeit, eine intraoesophageale Belastung mit *Candida albicans* abzuwehren, mit steigendem MIF-Gehalt des Serums signifikant anwächst (209).

2.4.5.3. Antikörper gegen Mediatoren

Ein wichtiger Schritt in der Erforschung der biologischen Wirkung von Mediatoren in vivo war die Entwicklung von Antiseren gegen Lymphokine (ALKS), über deren gelungene Herstellung erstmals 1975 berichtet wurde.

Verschiedene Wissenschaftler hatten gegen eine ganze Reihe unterschiedlicher Mediatoren (z.B. MIF, MF, SRF) ALKS hergestellt, von denen jedoch keines monospezifisch ein bestimmtes Lymphokin neutralisierte, was auf die unzureichende Reinheit der Mediatorengemische zurückzuführen war (11,60,66,237).

Durch verschiedene Verfahren gelang es, eine "second generation" von gereinigten, relativ spezifisch wirkenden ALKS herzustellen, mit denen auch in vivo Untersuchungen durchgeführt wurden (63,259).

Die wichtigste Erkenntnis daraus war, daß man Hautreaktionen vom verzögerten Typ durch intradermale Injektion von ALKS verhindern konnte, gleichgültig, ob die DTH durch vorhergehende Antigensensibilisierung, durch Verabreichung von Mediatoren oder durch Kontaktreaktionen z.B. mit hautreizenden chemischen Substanzen ausgelöst war (64).

Antilymphozytenserum beeinflusste die Aktivität von Mediatoren genauso wenig wie ALKS die Funktion von Lymphozyten, was ein Beweis dafür ist, daß sich die

ALKS tatsächlich gegen die löslichen Produkte von aktivierten Lymphozyten richteten und nicht gegen die Zellen selbst (11,63).

Gegen Interleukin 1, 2 und gegen den Osteoclast activating factor (OAF) wurden bereits monoklonale Antikörper hergestellt (25,223,129). Solche monospezifischen ALKS werden in der Zukunft nicht nur die Charakterisierung, Differenzierung und Zuordnung biologischer Effekte zu bestimmten Faktoren in vitro vereinfachen, sondern auch bei der Untersuchung von Mediatorenwirkungen in vivo eine wichtige Rolle einnehmen.

2.5. Ausblick

Die Erforschung der Rolle von Mediatoren im immunologischen Geschehen hat in den letzten zehn Jahren beträchtlichen Aufschwung erhalten. Davon zeugen unter anderem drei internationale Symposien, mehrere Bücher über Lymphokine, und seit 1980 auch eine eigene Zeitschrift ("Lymphokines"), die neueste Ergebnisse auf dem Gebiet der Mediatorenforschung veröffentlicht.

Physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge wurden klarer, und man ging daran, diese Erkenntnisse auch in klinischen Untersuchungen anzuwenden.

Zunächst befaßte man sich mit der diagnostischen Bewertung der Serumspiegel bestimmter Mediatoren bei verschiedenen lymphatischen Erkrankungen. Im Zusammenhang damit ergaben sich Möglichkeiten der Stimulierung bzw. Supprimierung der Mediatorproduktion durch Medikamente oder auch deren Substitution durch exogen erzeugte Mediatoren.

Die klinisch-therapeutische Anwendung scheint bei einigen infektiösen Erkrankungen erfolgreich zu sein, ferner wird dem Einsatz von Mediatoren in der antitumoralen Therapie immer größere Bedeutung beigemessen. Das belegt die Tatsache, daß das National Cancer Institut in den USA Lymphokine unter der Bezeichnung "biological response modifiers" in ein Entwicklungsprogramm biologischer Wirkstoffe gegen Krebs aufgenommen hat, welches u.a. Interferone, Thymosin und andere biologische Stoffe beinhaltet, die von potentieller therapeutischer Bedeutung bei der Krebsbehandlung sind (167).

Dem Ziel, Mediatoren in Diagnose und Therapie von Infektions- und Tumorerkrankungen erfolgreich einzusetzen, sind für die Zukunft noch umfangreiche Forschungen

vorangestellt.

Dumonde, ein Mann der "ersten Stunde" der Mediatorenforschung, gibt, zusammen mit seinen Mitarbeitern, in dem Buch "Immunoregulation" u.a. eine Bestandsaufnahme über den augenblicklichen Stand der Forschung auf diesem Gebiet. In einem kurzen Ausblick stellt er folgende Aufgaben in den Mittelpunkt der zukünftigen Arbeit (47):

- . Produktion und Anwendung von monoklonalen Antikörpern zur Trennung bzw. Zuordnung von Mediatoraktivitäten
- . Produktion von "monoklonalen" Lymphokinen in großen Mengen mittels Verwendung von lymphoiden Zelllinien und Einsatz von Großfermentern, u.a. zur Standardisierung der Mediatoraktivität für biologische Versuche
- . Aufklärung der biochemischen Struktur von Mediatoren über geeignete Reinigungs- und Charakterisierungsverfahren
- . Entwicklung weiterer Modelle zur Klärung der physiologischen Bedeutung von Mediatoren und ihrer Rolle bei pharmakologisch beeinflusster Immunmodulation
- . Aufklärung der Zusammenhänge zwischen molekularen Vorgängen bei der zellvermittelten Immunität und den Rezeptoren, Agonisten und Antagonisten von Mediatoren
- . Untersuchung der Beziehung zwischen abnormer Mediatorproduktion und immunpathologischen Vorgängen
- . Überprüfung des therapeutischen Wertes von Stimulierung und Supprimierung der Mediatorbildung, sowie des therapeutischen Wertes exogen hergestellter Mediatoren
- . Übereinkommen und Klärung in Nomenklatur, Klassifizierung und biochemischer Charakterisierung

Obwohl diese Aufstellung nur einen Teil vieler noch ungeklärter Probleme umfaßt, gibt sie doch eine Vorstellung, womit sich die Mediatorenforschung in den nächsten Jahren beschäftigen muß.

3. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Verwendete Zellkulturen

3.1.1.1. Zellkulturen aus Organen

Aus Organen von steril gewonnenen Rinderföten (Schlachthof München) wurden durch übliche Trypsinierungstechnik (136) Zellkulturen hergestellt. Die in Gewebekulturgefäßen adhären-
rent wachsenden Zellen (BEL=Bovine embryonic lungs und BEK=Bovine embryonic kidney) wurden bis zur vollständigen Dichte des Zellrasens im Brutschrank bei 37°C bebrütet, wobei folgendes Kulturmedium verwendet wurde:

Earle's Minimum Essential Medium (MEM) mit 1,5% NaHCO_3 und 5% fetalem Kälberserum (FCS, Fa.Seromed, München) zur Anzucht, bzw. 2% FCS zur Zellerhaltung. Pro ml Medium waren 100 IE Penicillin, 100 μg Streptomycin und 2 μg Amphotericin B zugesetzt.

Für die in Suspension wachsenden Mäusemilzzellen (MSC= Mouse spleen cells) wurde als Kulturmedium Hepes-gepuffertes RPMI 1640 (Fa. Seromed, München) mit 10% FCS und den o.g. Antibiotikazusätzen verwendet.

3.1.1.2. Permanente Zell-Linien

Bei VERO-(Affennierenzellen) und LTK-Zellen (Subcutiszellen, Maus) handelte es sich um adhären-
t wachsende, dauerpassierte Zellen, die in Plastikkulturflaschen (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit MEM (2% FCS, 1,5% NaHCO_3) als Medium gehalten wurden.

RAJI- und JURKAT-Zellen sind in Suspension wachsende lymphoide Zellen, die in Spinnergefäßen (Fa. Bellco) im

Brutraum bei 37°C kultiviert wurden. Als Medium diente Hepes-gepuffertes RPMI 1640 mit 10% FCS, 1,5% NaHCO_3 und den o.g. Antibiotikazusätzen.

3.1.1.3. Hybridoma-Zellen

Die in Suspension wachsenden Mäuse-B-Hybridomazellen (KHLYK) entstammten einer Fusion von Mäusemilzzellen und einem Subklon der Mäusemyelomzell-Linie P3-X 63-Ag 8, die mit X 63-Ag 8653 bezeichnet wurde (230).

Die Hybridomas wurden zunächst in 250 ml-Bettflaschen in einem CO_2 -Brutschrank (Atmosphärenluft + 5% CO_2) bei 37°C vermehrt, wobei als Medium MEM mit 5% FCS, 1,5% NaHCO_3 , sowie den üblichen Antibiotikazusätzen benutzt wurde.

Größere Mengen der Zellsuspension wurden später ebenfalls in Spinnergefäßen oder in einem Laborfermenter (Fa. Chemap, Männedorf, Schweiz) kultiviert.

Die Teilungsrate der Hybridomas wurde der Vermehrungsgeschwindigkeit angepaßt, bei optimalem Wachstum betrug sie 1:3 (2-3 mal pro Woche).

Tabelle 13 : Verwendete Zellkulturen

Bezeichnung	Herkunftsspezies	Zellart
B E L	Rind	Fetale Kälberlungenzellen (bovine embryonic lungs)
B E K	Rind	Fetale Kälbernierenzellen (bovine embryonic kidney)
V E R O	Affe	Permanente Nierenzelllinie
L T K	Maus	Permanente Subcutiszelllinie
M S C	Maus	Mäusemilzzellen (mouse spleen cells)
K H L Y K	Maus	B-Hybridomazellen (Milz-Myelomzellfusion)
R A J I	Mensch	Lymphomazellen (Burkitt-Tumor)
J U R K A T	Mensch	Lymphomazellen (Burkitt-Tumor)

3.1.2. Zur Zellstimulierung verwendete Substanzen

Für den weitaus größten Teil der Stimulierungsversuche wurde ein von Mayr und Mitarbeitern entwickelter, biologischer Paramunitätsinducer verwendet:

PIND-ORF, ein hitze- bzw. β -Propiolacton inaktiviertes Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701.

Dieser Inducer erwies sich als Vermittler eines starken, unspezifischen Schutzes in Mäuse-Infektionsmodellen (140) und war auch in der Lage, die Tumorangehrate eines Mäuse-osteosarkoms erheblich zu senken (152). Zur Verwendung kamen drei verschiedene Chargen:

. PIND-ORF 002,

entwickelt aus der 135. ENL-(embryonale Niere Lamm), plaquegereinigt (141), und 5. BEL-Kulturpassage mit einem Ausgangstiter von $10^{8,25}$ TCID/ml, hitzeinaktiviert (2h, 56°C)

. PIND-ORF 003,

entwickelt aus der 135. ENL-, 29. BEL-Kulturpassage mit einem Ausgangstiter von $10^{7,5}$ TCID/ml, hitzeinaktiviert (2h, 56°C) mit einem Stabilisierungszusatz von 2,5% Gelatine

. PIND-ORF β -PL,

entwickelt aus der 135. ENL-, 33. BEL-Kulturpassage mit einem Ausgangstiter von $10^{7,0}$ TCID/ml, inaktiviert mit β -Propiolacton, Endkonzentration 0,06% (Fa. Serva).

Einige Male wurde zur Stimulierung PIND-AVI 029 verwendet, ein ebenfalls von Mayr entwickelter Paramunitätsinducer auf der Basis des strahleninaktivierten Avipoxvirus, Stamm HP 1.

Nur in wenigen Versuchen wurden folgende Substanzen eingesetzt:

LPS, ein Lipopolysaccharid aus Salmonella typhosa, das v.a. als Mitogen für B-Lymphozyten bekannt ist (Fa. Difco, Detroit, USA). Weiterhin Concanavalin A (Con A), ein aus Pflanzen gewonnenes Metalloprotein, das gleichfalls zur Lymphozytenstimulation (v.a. T-Zellen) verwendet wird (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Einmalig kamen zur Anwendung:

Tetanus-Toxoid (TT), ein Formalin-inaktiviertes Tetanus-Toxin (Fa. Behring, Marburg), als Tetanus-Vakzine und Lymphozytenstimulans verwendet, und schließlich Poly-IC, ein synthetisches, hochmolekulares doppelsträngiges Polynucleotid, das als guter Interferon-Inducer bei der Maus bekannt ist (Fa. Sigma, München).

Tabelle 14 : Zur Zellstimulierung verwendete Substanzen

Bezeichnung	Zusammensetzung
PIND-ORF 002,003	Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 hitzeinaktiviert (2h, 56°C)
PIND-Orf β -PL	Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 β -Propiolacton 0,06% inaktiviert
PIND-AVI 029	Avipoxvirus, Stamm HP 1 strahleninaktiviert
LPS	Lipopolysaccharid aus Salmonella typhosa
Con A	Concanavalin A pflanzliches Metalloprotein
Tetanus-Toxoid	Formalin-inaktiviertes Tetanus-Toxin
Poly-IC	synthetisches, doppelsträngiges Polynucleotid

3.1.3. Technischer Ablauf der Mediatorengewinnung

3.1.3.1. Zelldichte

Adhärenent wachsende Zellen (BEL, BEK, VERO, LTK) wurden bis zur vollständigen Dichte des Zellrasens inkubiert und dann stimuliert.

In Suspension wachsende Zellen (KHLYK, RAJI, JURKAT) wurden auf eine Zellzahl von ca. $1 \cdot 10^6$ lebende Zellen/ml Medium eingestellt und anschließend stimuliert.

Zellzahl und Lebensfähigkeit der Zellen

Die Bestimmung wurde nach der Methode BØYUM (22) durchgeführt:

Dafür werden 0,1 ml der Zellsuspension mit 9,4 ml PBS (phosphate buffered saline) und 0,5 ml 1%ige Trypanblaulösung 1:100 verdünnt und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt, wobei auch der prozentuale Anteil der gefärbten, d.h. der toten Zellen bestimmt wird.

Die Einstellung der gewünschten Zellzahl/ml erfolgt nach folgender Formel (136):

$$\text{ml Medium} = \frac{\text{Zellzahl gezählt} \cdot 500\,000 \cdot \text{ml Sediment}}{\text{gewünschte Zellzahl/ml}}$$

3.1.3.2. Zellstimulation

Nach Einstellen der gewünschten Zellzahl bzw. nach vollständiger Dichte des Zellrasens wurden die Zellkulturen mit der gewünschten Konzentration (Menge) der potentiell stimulierenden Substanz beimpft.

Nach der Stimulation wurden die Zellkulturen täglich auf eventuelle cytopathische Veränderungen lichtmikroskopisch untersucht.

Teilungsversuch

Mit der KHLVK-Zellkultur T1-T5 wurde ein Teilungsversuch durchgeführt:

500 ml Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ /ml) wurden mit 5 ml PIND-ORF 002, aufgelöst in TRIS-Puffer pH 10, stimuliert und 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

250 ml dieser Zellsuspension wurden durch Einfrieren bei -20°C geerntet, die andere Hälfte wurde 1:3 geteilt und ohne weitere Stimulierung wieder 48 Stunden bebrütet. Dieser Vorgang wurde analog bis zur 10. Zellteilung wiederholt, wobei bei jeder 2. Teilung jeweils 250 ml Zellen geerntet wurden. Diese 5 Fraktionen wurden anschließend aufgetaut, 20 Minuten bei 2100 g zentrifugiert, in der AMICON-Ultrafiltrationszelle mit der Membran PM 30 konzentriert und schließlich durch einen 0,22µ-Filter (Fa. Millipore, Neu-Isenburg) filtriert. Die paramunisierende Wirkung der Zellkulturüberstände (ZKÜ) wurde anschließend in den Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV geprüft (s. 3.1.5.).

3.1.3.3. Inkubationsdauer

Die Inkubationszeiten nach der Zellstimulierung lagen zwischen 19 und 96 Stunden.

3.1.3.4. Ernteverfahren

Zur Beendigung der Inkubation wurde die Mehrheit der Zellkulturen bei -20°C eingefroren.

Die ZKÜ 7, 8, 9 und 22 K wurden ohne Einfrieren weiterbehandelt.

3.1.3.5. Weitere Behandlung

Nach dem Auftauen der Zellkulturen bei Zimmertemperatur wurden die Zellen bei einem Teil der ZKÜ (1, 2, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 20 K) 5 Minuten ultrabeschallt (Sonifier Cell Disruptor B-30, Fa. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, intermittierend, Stufe 4).

Diese und alle anderen ZKÜ wurden folgendermaßen weiterbehandelt:

Zentrifugation

Zur Abtrennung der Zellbestandteile wurde das Zellkulturmedium jeweils 20 Minuten bei 2100 g zentrifugiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Ultrafiltration und Konzentration

Die Einengung der ZKÜ erfolgte anschließend mit Hilfe von Ultrafiltrationsgeräten.

Kleinere Mengen ZKÜ wurden mit einem Gerät der Firma AMICON, Witten (Stirred Ultrafiltration Cell, Model 402) ultrafiltriert, größere Mengen (ab 2000 ml) mit dem PELLICON-Kassetten-System der Firma Millipore, Neu-Isenburg. Folgende Molekulargewichtsabscheidungen wurden durchgeführt:

Im AMICON-Gerät wurden die Membranen PM 10 und PM 30 verwendet, womit Stoffe mit einem Molekulargewicht (MG) größer 10 000 Dalton bzw. 30 000 Dalton (PM 30) im Retentat = Konzentrat zurückgehalten wurden.

Im PELLICON-Kassetten-System wurde zur Vorfiltration der ZKÜ (Stimulatorabtrennung) die Ultrafiltrationskassette PTHK mit einer nominalen Molekulargewichtstrenngrenze (NMGG) von 100 000 Dalton benützt, zur anschließenden Konzentrierung die Kassette PTCG mit einer NMGG von

10 000 Dalton. Durchschnittlich wurden die ZKÜ auf das 10-12fache des Ausgangsvolumens eingeengt.

3.1.3.6. Inducervirus-Entfernung

Um eventuell mitkonzentrierte Viruspartikel bei Virus-inducer stimulierten ZKÜ zu entfernen, wurden die konzentrierten ZKÜ durch einen 0,22 μ -Filter (Fa. Millipore) gefiltert. Dadurch werden Molekulargewichte von ca. 500 000 Dalton zurückgehalten.

Aus größeren Mengen ZKÜ (ab 2000 ml) wurden durch Vorfiltration mit der PTHK-Kassette (NMGG 100 000) unter sterilen Bedingungen die Stimulatorvirus-Partikel entfernt (Partikelgröße ca. 350x230 nm, MG etwa einige Millionen Dalton).

Die Virusfreiheit der fertigen ZKÜ wurde im Elektronenmikroskop überprüft, ferner erfolgte eine Überprüfung auf eventuelle Zellkultur-Infektiosität der ZKÜ in hochempfindlichen Zellkulturen (BEL, 3 Subpassagen).

3.1.3.7. Lagerung

Die auf diese Weise hergestellten ZKÜ wurden bei + 4°C gelagert.

Mit ZKÜ 23 wurde zusätzlich ein Lagerungsversuch durchgeführt. Dafür wurde ein Teil des ZKÜ lyophilisiert, ein anderer Teil bei -20°C eingefroren. Der Rest wurde flüssig sowohl bei 37°C, bei 20°C (Zimmertemperatur) und bei 4°C über einen unterschiedlich langen Zeitraum hinweg gelagert. Die Stabilität der ZKÜ nach der Lagerung wurde anschließend bei in vivo-Versuchen getestet.

Eine Übersicht über die Bezeichnung der ZKÜ, die Herstellungsart und variierende Parameter bei der Produktion geben die Tabellen 15a - 15e.

Tabelle 15a : Hybridoma (KHLYK)-Zellkulturen (ZK), stimuliert mit PIND-ORF 002, aufgelöst in TRIS-Puffer pH 10 (Menge: 1,0 ml/100 ml Medium)

ZKÜ* Nr.	Stimul. dauer	Konzentration mit Ultrafilter	Bemerkung
1	24 h	PM 10 AMICON	ultrabeschallt
2	96 h	"	ultrabeschallt
4	48 h	"	
5 **	96 h	"	
6	24 h	"	
7	48 h	"	Zellen für ZK 8 verwendet
8 **	96 h	"	Zellen für ZK 9 verwendet
9 **	96 h	"	nicht tiefgefroren
10	46 h	PELLICON PTCG	
11	19 h	PM 30 AMICON	ultrabeschallt
13	72 h	"	ultrabeschallt
14	72 h	"	
15	48 h	"	
23	60 h	PELLICON PTCG	
24	24 h	"	

* Zellkulturüberstand

** Stimulationsmenge: 0,5 ml/100 ml Medium

Tabelle 15b : Zellkulturen (ZK), stimuliert mit PIND-ORF 003*, aufgelöst in TRIS-Puffer pH 10, bzw. mit PIND-ORF 8-PL**, aufgelöst in MEM, pH 7,4
(Stimulationsmenge: 1,0 ml/100 ml Medium)

ZKÜ Nr.	Zellart	Stimul. Dauer	Konzentration mit Ultrafilter	Bemerkung
17 *	Hybridoma (KHLK)	48 h	PM 30 AMICON	ultrabeschallt
18 *	"	72 h	"	ultrabeschallt
19 *	"	72 h	"	
BL 2 *	Organzellen (BEL)	48 h	"	
BK 1 *	Organzellen (BEK)	96 h	PM 10 AMICON	
26 **	Hybridoma (KHLK)	26 h	"	
Rpo 1 **	Tumorlinie (RAJI)	48 h	"	

Tabelle 15c : Zellkulturen (ZK), stimuliert mit PIND-AVI 029, aufgelöst in Aqua dest.

ZKÜ Nr.	Zellart	Stimul. Dauer	Stimulations- menge	Konzentration mit Ultrafilter
25	Hybridoma (KHLYK)	26 h	1,0 ml/100 ml	PM 10 AMICON
BL 1	Organkultur (BEL)	72 h	2,0 ml/100 ml	"
BK 2	" (BEK)	72 h	4,0 ml/100 ml	PM 30 AMICON
J 1	Tumorlinie (JURKAT)	24 h	5,0 ml/100 ml	PM 10 AMICON

Tabelle 15d : Zellkulturen (ZK), nicht stimuliert (Kontrollsubstanzen)

ZKÜ Nr.	Zellart	Inkub. Dauer	Konzentration mit Ultrafilter	Bemerkung
20K	Hybridoma (KHLYK)	24 h	PM 30 AMICON	ultrabeschallt
21K	"	72 h	"	
22K	"	72 h	PM 10 AMICON	nicht tiefgefroren
Rpo 0	Tumorlinie (RAJI)	48 h	PM 30 AMICON	

Tabelle 15e : Zellkulturen (ZK), mit verschiedenen Substanzen stimuliert *

ZKÜ Nr.	Zellart	Stimulationssubstanz und - Menge	Stimulations- dauer
CA 1	Hybridoma (KHLYK)	Concanavalin A 5,0 µg/ml	48 h
A 1	"	LPS 1,0 mg/ml	20 h
T 1	"	Tetanus-Toxoid 0,1 ml/ml	48 h
Rpo 2	Tumorlinie (RAJI)	Poly-IC 500 µg/ml	22 h
MM 1	Organkultur (MSC)	Concanavalin A 5,0 µg/ml	48 h
MM 2	"	LPS 2,0 mg/ml	24 h
J 2	Tumorlinie (JURKAT)	Concanavalin A 5,0 µg/ml	24 h
V 1	Zelllinie (VERO)	PIND-ORF 002 0,1 ml/ml	48 h
L 1	" (LTK)	PIND-ORF 002 0,1 ml/ml	26 h

* Die Konzentrierung erfolgte mit der Ultrafiltrationsmembran PM 10 (AMICON)

3.1.3.8. Placebos

In den Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV (s.3.1.5.) wurden NaCl-Phosphatpuffer (NaCl-PP) und fetales Kälberserum (FCS) als Kontrollpräparate verwendet.

Daneben wurden auch Einzelkomponenten der stimulierten Zellkulturüberstände (Medium, Stimulatorsubstanz), sowie unstimulierte Zellkulturüberstände auf ihre in vivo-Wirkung untersucht.

Tabelle 16 : In VSV- und AV-Belastungsmodellen
verwendete Kontrollpräparate und Placebos

Placebobezeichnung	Zusammensetzung
P O 1	NaCl-Phosphatpuffer
P O 2	Fetales Kälberserum
P O 3	Earle MEM mit 10% FCS + Stimulator- substanz PIND-ORF 002 (1,0 ml/100 ml)
P O 4	Earle MEM + Stimulatorsubstanz PIND-ORF 002 (1,0 ml/100 ml)
P O 5	Zellkulturüberstand (KHLYK), nicht stimuliert (20K, 21K, 22K)
P O 6	Stimulatorsubstanz PIND-ORF 002, virusfreies Filtrat (0,22 μ -Filter)

PO 3,4 und 5 wurden den selben Behandlungsmethoden wie die anderen ZKU unterzogen (Inkubation, Einfrieren, Ultra-
beschallung, Zentrifugation, Filtration und Konzentration).

3.1.4. Serologische Untersuchungen

Antikörpernachweis gegen Orf-Virus in den ZKÜ

Um zu prüfen, ob KHLVK-Zellkulturen nach Stimulierung mit dem Paramunitätsinducer PIND-ORF Antikörper gegen Orf-Virus sezernieren, wurden die ZKÜ mittels ELISA-Test (50, 94) auf ihren IgG-Antikörpergehalt gegen Orf untersucht.

Antikörpernachweis gegen Aujeszky-Virus im Serum

von Mäusen

Von überlebenden Tieren der AV-Infektionsbelastungsversuche Nr. 2 (19 Mäuse, mit ZKÜ 1 vorbehandelt = Gruppe 1, 18 Mäuse, mit ZKÜ 17 vorbehandelt = Gruppe 2) und Nr. 3 (19 Mäuse, mit ZKÜ 4 vorbehandelt = Gruppe 3) wurde mit dem ELISA-Test der IgG-Antikörpertiter gegen AV ermittelt.

Es sollte geprüft werden, in wie weit der Infektionsschutz gegen Aujeszky-Virus mit dem Vorhandensein von Serumantikörpern zusammenhängt.

3.1.5. In vivo-Untersuchungen zum Nachweis der Mediatorenwirkung

3.1.5.1. Infektionsbelastungsmodell

"Babymaus" / Vesicularis Stomatitis Virus (VSV)

Die Stomatitis Vesicularis Virus-Infektion der Babymaus ist aufgrund der hohen Empfänglichkeit neugeborener NMRI-Mäuse eine empfindliche Screening-Methode zur Überprüfung und Wirksamkeitsbestimmung von Paramunitätsinducern. Es wurde getestet, ob die Mortalität von Babymäusen nach VSV-Infektion durch vorherige Behandlung mit den ZKU beeinflusst werden kann.

Behandlung

Die Testsubstanzen wurden jeweils 24 Stunden vor der Belastung (challenge) subcutan in einer Dosierung von 0,1 ml pro Tier verabreicht.

Als Kontrollpräparate wurden NaCl-PP, sowie verschiedene andere Placebos verwendet (s. 3.1.3.8.).

Infektionsversuch

Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten 2-3 Tage alte Babymäuse (Stamm NMRI, Gesellschaft für Medizinische Versuchstierzucht, Dr. Ivanovas, Kissleg).

Die Gruppengröße lag im Durchschnitt bei 32 Tieren (22-45), die entsprechend den physiologischen Wurfgrößen auf alle laktierenden Muttertiere verteilt wurden.

Belastungsvirus und Infektionsmodus

Zur Infektion wurde das Virus der Stomatitis vesicularis verwendet: 17. Kulturpassage auf Hühnerembryo-fibroblasten-Zellkulturen vom 17.10.1981 (Titer: $10^{7,25}$ TCID₅₀/ml).

Eine Infektionsdosis betrug 10-50 LD₅₀. Die Virusbelastung erfolgte 24 Stunden nach Applikation der Testsubstanzen durch intraperitonäale Verabreichung einer Infektionsdosis (0,1 ml). Zur Veranschaulichung des Modells siehe Abbildung 2.

Auswertung der Versuche

Zur Auswertung kam die Mortalität innerhalb einer Versuchsgruppe, verglichen zu einer gleichgroßen Kontrollgruppe, die parallel zu jedem Versuchsansatz mit NaCl-PP behandelt wurde.

Die Bewertung erfolgte durch die Berechnung eines Wirkungsindex (WI).

Wirkungsindex

Nach Berechnung der prozentualen Absterbequote in den Versuchs- und Kontrollgruppen wurde der Index nach der Formel von RAETTIG wie folgt bestimmt:

$$WI = \frac{b - a}{b} \cdot 100$$

wobei

a = Mortalität der Versuchsgruppe (in %)

b = Mortalität der Kontrollgruppe (in %)

Wirkungseinheit

Um einen Wirkungsvergleich mit anderen Paramunitäts-inducern durchführen zu können, wurden für einige ZKU (1, 4, 23) die Wirkungseinheiten (WE) pro ml nach folgender Grundlage berechnet:

Die geforderte Mindestwirksamkeit erreicht eine Testsubstanz im VSV-Modell bei einem Wirkungsindex von 20. Anhand der Wirkungsindices bei verschiedenen Verdünnungsstufen lassen sich die Wirkungseinheiten pro applizierter Dosismenge errechnen:

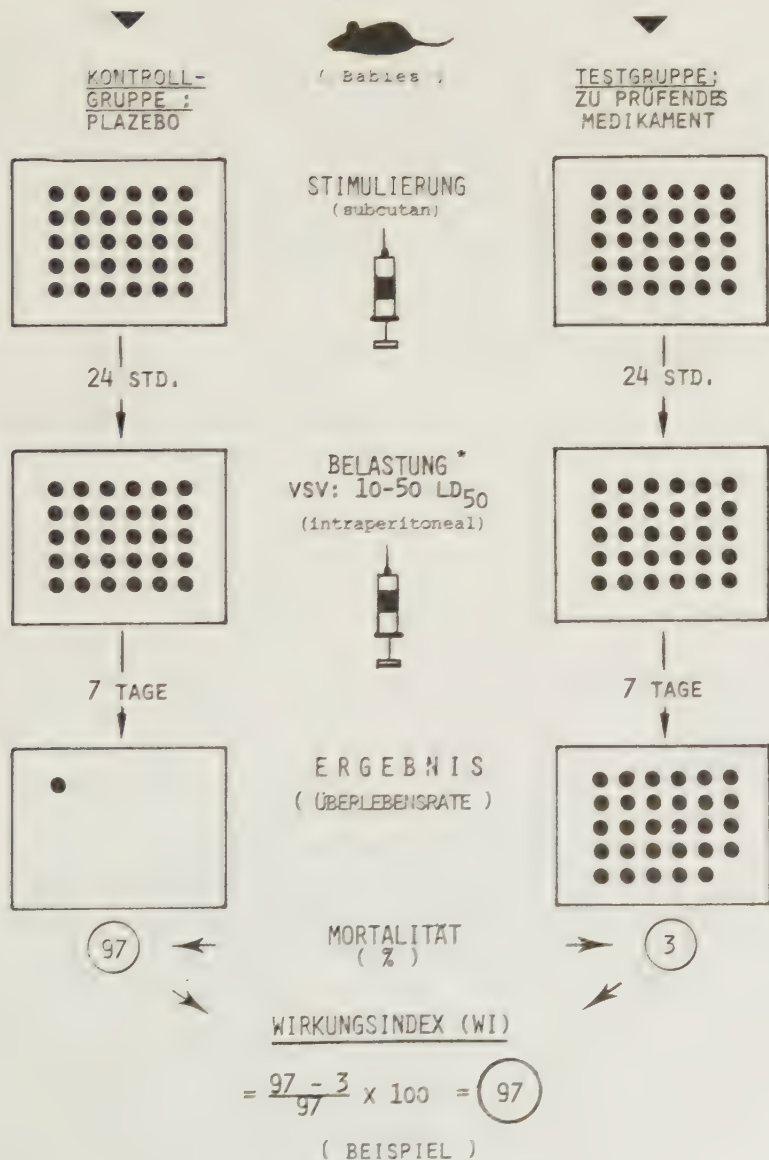
1 WE / appl. Dosismenge (sie betrug im VSV-Test 0,1 ml) ist bei der Verdünnungsstufe erreicht, bei der noch ein Wirkungsindex von 20 erzielt wird.

In der unverdünnten Ausgangssubstanz ist dementsprechend die Anzahl der WE um das Vielfache der Endverdünnung höher.

Abbildung 2 :

VSV - MODELL

NACHWEIS EINER STIMULIERUNG DER UNSPEZIFISCHEN
KÖRPEREIGENEN ABWEHR



* VIRUS DER STOMATITIS VESICULARIS

3.1.5.2. Infektionsbelastungsmodell

Adulte Maus / Aujeszky-Virus (AV)

Es wurde getestet, in wie weit durch Behandlung mit den ZKU die Mortalität von Versuchstieren nach Infektion mit einem Herpesvirus beeinflusst werden kann.

Als Belastungsvirus wurde das Virus der Aujeszky'schen Krankheit benutzt, ein Herpesvirus, das in zahlreichen Zellkulturpassagen attenuiert wurde, und für erwachsene Mäuse hochvirulent ist.

Behandlung

Die Verabreichung der Testsubstanzen erfolgte 24 Stunden vor der Belastung. Untersucht wurde die Mortalität nach intraperitonäaler (Dosismenge 0,2 ml), teilweise subcutaner (0,4 ml) und intravenöser Applikation (0,2 ml) der Testsubstanzen. Die Versuchstiere der Kontrollgruppen erhielten bei gleicher Applikationsart die gleiche Menge NaCl-PP oder verschiedener anderer Placebos.

Infektionsversuch

Tiermaterial

Die Versuchstiere waren weibliche NMRI-Mäuse, 18-20 g schwer (Gesellschaft für Med. Versuchstierzucht, Kisslegg). Durchschnittlich wurde pro Testsubstanz eine Gruppe von 20 (15-30) Tieren zusammengestellt, ebenso für die Kontrollgruppen.

Belastungsvirus und Infektionsmodus

Ausgangsmaterial für das Belastungs-Virus war der AV-Stamm Hannover in der 23. BEL-Kulturpassage vom 10.6.1982 (Titer: $10^{8,0}$ TCID₅₀/ml).

Die Belastung erfolgte 24 Stunden nach Verabreichung der Testsubstanzen. Infiziert wurden alle Tiere intra-peritonäal, wobei die Dosismenge (0,2 ml der verabreichten Gebrauchsverdünnung) etwa 10-50 LD₅₀ enthielt. Die Tiere wurden 14 Tage lang nach der Belastung beobachtet. In diesem Zeitraum wurde die Mortalität in den Versuchsgruppen und in den Kontrollgruppen ermittelt. Die höchste Morbidität (akute Erkrankung) und Mortalität (subakute Erkrankung) trat zwischen dem 3. und 6. Tag post infectionem auf. Da die akute Erkrankung ebenfalls immer zum Tode führte, wurden Tiere mit akuten Krankheitssymptomen schmerzlos getötet.

Doppelbelastung

Von überlebenden Tieren der Versuche Nr. 2 und Nr. 3 wurde 14 Tage p.i. mittels ELISA-Test der Antikörpertiter gegen AV ermittelt.

19 Tiere wurden ohne erneute Vorbehandlung 14 Tage nach der ersten Infektion, die sie schadlos überlebt hatten, erneut einer Infektion mit AV (gleiche Dosis) ausgesetzt, um zu testen, in wie weit der Infektionsschutz gegen AV vom Serumantikörpertiter der Versuchstiere beeinflusst wird.

Auswertung der Versuche

Die Auswertung erfolgte in gleicher Weise wie im Infektionsbelastungsmodell VSV (s. 3.1.5.1.).

Die überlebenden Tiere eines Versuchs wurden schmerzlos durch eine überdosierte Äthernarkose getötet.

3.1.6. In vitro-Teste zum Nachweis spezifischer
Mediatorenwirkungen

3.1.6.1. Untersuchung der Stimulierbarkeit von
Lymphozyten über Messung des Einbaus von
(U-¹⁴C)-Thymidin in ihre DNA

Isolierung der Lymphozyten aus dem Blut vom Schwein

und vom Menschen

Schweineblut wurde unmittelbar nach Tötung von Schlacht-
tieren durch Auffangen des Blutstrahls aus der Vena
jugularis in einem 100 ml-Fläschchen mit 500 IE Heparin
gewonnen.

Die Blutentnahme beim Menschen erfolgte unter sterilen
Kautelen aus der Vena mediana cubiti mit einer sterilen
25 ml-Einmalspritze, die 100 IE Heparin enthielt.

Zur Isolierung der Lymphozyten wurde das Dichtegradienten-
verfahren verwendet (170):

Je 20 ml heparinisiertes Blut (500 IE/100 ml Blut) wurden
mit gleichen Teilen PBS verdünnt. Mit 15 ml dieses Ge-
misches wurden gleiche Teile Ficoll-Paque (Fa. Pharmacia,
Uppsala) in Glaszentrifugengläsern vorsichtig mit einer
10 ml-Pipette überschichtet. Anschließend wurde bei Raum-
temperatur 40 Minuten bei 500 g zentrifugiert.

Aufgrund der verschiedenen Dichte der flüssigen Phasen,
sowie wegen der unterschiedlichen Masse der Zellen,
ergibt sich nach der Zentrifugation folgende Schichtung (178):

- ein Bodensatz aus Erythrozyten und Granulozyten
- darüber das Ficoll-Paque-Gemisch
- auf dessen Oberfläche eine schmale, weiße Schicht von
Lymphozyten (mit einem Anteil von ca. 10% Makrophagen)
- als oberste Schicht ein Plasma-PBS-Gemisch mit Thrombo-
zyten.

Nach Entfernung der obersten Schicht wurden die Lymphozyten vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, in neue Zentrifugengläser gefüllt und mit Zellkulturmedium RPMI 1640 auf ca. 100 ml aufgefüllt (Waschen der Zellen).

RPMI 1640 wurde in folgender Zusammensetzung verwendet: Pro 500 ml waren 1,25 ml Hepes (Puffersubstanz nach Good), 1,0 ml Bycomycin (Fa. Byk Gulden, Konstanz), 0,5 ml Kanamycin (Fa. Grünenthal, Stolberg) und 50 ml FCS zugesetzt.

Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert, gezählt und der Anteil der lebenden Zellen überprüft (s. 3.1.3.1.). Nur Zellfraktionen mit einer Lebensfähigkeit von mehr als 95% wurden weiterverwendet.

Zellpräparation aus der Milz von Mäusen

Pro Test wurden jeweils die Milzen von 5 Tieren (NMRI-Mäuse, weiblich, 18-20 g schwer) gepoolt.

Nach Entnahme der Milzen unter sterilen Bedingungen erfolgte ihre mechanische Zerkleinerung und anschließendes Passieren durch eine sterile 6-fache Gazelage unter Zugabe von PBS. Das Filtrat wurde mit PBS auf ca. 100 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt, das Sediment zur Lysierung der Erythrozyten mit 5 ml einer 0,83%igen Ammoniumchloridlösung 1 Minute lang resuspendiert, mit 15 ml RPMI 1640 aufgefüllt und 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen zweimal mit RPMI 1640 gewaschen, das Sediment anschließend in 2 ml Medium aufgenommen und eine Zellzählung durchgeführt (s. 3.1.3.1.).

Lymphozytenstimulation

Die gezählten und auf ihre Vitalität geprüften Lymphozyten wurden mit RPMI 1640 auf eine Zellzahl von ca. $5 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Mittels einer Pipetman-Pipette (Fa. Abimed, Düsseldorf) wurden jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (U-Form, Fa. Nunc, Wiesbaden) gefüllt. Zu der Zellsuspension kam dann die gleiche Menge der jeweiligen zu testenden Substanz in der entsprechenden Gebrauchsverdünnung, wobei jeder Ansatz fünffach ausgeführt wurde. Die Zellkontrollen wurden jeweils nur mit RPMI 1640 in der den Testsubstanzen entsprechenden Menge beschickt.

Die Platten wurden steril abgedeckt und 48 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5% CO₂) inkubiert. Dann erfolgte die Markierung der Ansätze durch Zugabe von je 25 μ l/Plattentiefung einer 1 μ Ci/ml enthaltenden (U-¹⁴C)-Thymidinlösung (spezifische Aktivität 500-600 mCi/mMol, Radiochemical Center Ltd, Amersham) und eine weitere, über 24 Stunden dauernde Inkubation mit nachfolgendem Einfrieren der Platten bei -20°C.

Zur Zellernte wurden die Mikrotiterplatten bei Zimmertemperatur aufgetaut und die Zellen mit einem Automash-Zellerntegerät (Fa. Dynatech, Nürtingen) mit aqua dest. auf Filterstreifen gesaugt (Millipore AP 200255000).

Das in die DNA der Lymphozyten eingebaute makromolekulare Thymidin bleibt dabei im Filter hängen, das nicht eingebaute wird durchgewaschen.

Die Filterstreifen wurden bei 80°C im Brutschrank 20 Minuten getrocknet, dann wurde ein Äther-Methanolgemisch (1:10) aufgetropft, und noch einmal 20 Minuten getrocknet.

Mit einer Pinzette wurden die einzelnen Filter dem Streifen entnommen und in Zählfläschchen aus Kunststoff gegeben (Fa. Zinsser, Frankfurt). Dazu kamen 5 ml Szintillationsflüssigkeit pro Fläschchen (Unisolve I, Fa. Zinsser).

Nach 20 Minuten Kühlung im Szintillationsgerät (Fa. Isocap Nuclear, Chicago) wurde die Thymidineinbaurrate in counts per minute (cpm) jeweils über die Dauer von 2 Minuten im Flüssigszintillationszähler gemessen.

Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der vom Szintillationszähler erfassten und ausgedruckten Werte erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Mittelwert (cpm)} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Standardabweichung} \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Standardfehler} \quad s_e = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Stimulationsindex} \quad s_i = \frac{\bar{x} \text{ Proben}}{\bar{x} \text{ Kontrollen}}$$

wobei n = Anzahl der Proben = 5
und x = Anzahl der counts/min.

3.1.6.2. Untersuchung über die Stimulierbarkeit der Phagozytose mittels eines Latex-Inkorporationstests

In vitro wurde geprüft, ob und in wie weit die Phagozytosefähigkeit peripherer Blutzellen verschiedener Spezies durch die Testsubstanzen beeinflusst wird.

Durchführung

0,5 ml heparinisiertes Blut verschiedener Spezies (Schwein, Rind, Maus, Mensch) wurden mit 0,1 ml einer Latexsuspension (1 ml Bacto-Latex, Fa. Difco, Detroit, Partikelgröße 0,81 μ , mit physiologischer NaCl 1:50 verdünnt) gut gemischt, mit 0,1 ml der Testsubstanzen versetzt und bei 37°C unter leichtem Schütteln (elektrischer Schüttler) 1 Stunde lang inkubiert.

Anschließend wurde ein Objektträger-Ausstrich angefertigt. Dazu bringt man mit einer Mikropipette ca. 5 μ l auf den Objektträger und streicht sie mit einem Deckglas dünn und gleichmäßig aus. Die Ausstriche werden luftgetrocknet und anschließend nach der Methode von WRIGHT gefärbt.

Die Präparate wurden bei 1000-facher Vergrößerung auf Zellen, die Latexpartikel inkorporiert hatten, durchgemustert. Dabei waren die Latexteilchen infolge doppelter Lichtbrechung sehr gut sichtbar.

Auswertung

Pro Probe wurden 25 phagozytierende Zellen (Monozyten, neutrophile Granulozyten) ausgewertet.

Es wurden sowohl der prozentuale Anteil der zur Phagozytose fähigen Zellen (Phagozytose-Prozentsatz) als auch die Anzahl der pro Zelle aufgenommenen Latexteilchen (Phagozytose-Index) registriert.

3.1.6.3. Untersuchung über die Stimulierbarkeit der
natürlichen (spontanen) zellvermittelten
Zytotoxizität mittels eines ^{51}Cr -Freisetzungs-
tests

Die natürliche (spontane) zellvermittelte Zytotoxizität der Milzzellpopulation von 4 Wochen alten, weiblichen Balb/c-Mäusen wurde in einem Chromium 51-Freisetzungstest untersucht.

Zielzellen (targets)

Als Zielzellen dienten adhärent wachsende Vero-Zellen (permanente Affennieren-Zelllinie).

Die Vero-Zellen wurden mit 0,05%igem Trypsin von den Glas- kulturflaschen abgelöst, bei 600 g zentrifugiert und in Zellkulturmedium RPMI 1640, das grundsätzlich mit 10% FCS verwendet wurde, resuspendiert. Anschließend wurden diese Zellen in 100 ml RPMI 1640 bei 37°C unter vorsichti- gem Rühren 1 Stunde lang inkubiert, um die Membranstabili- tät wiederherzustellen. Danach wurden die Zielzellen er- neut zentrifugiert und nach Trypanblaufärbung (s. 3.1.3.1.) auf $5 \cdot 10^4$ lebende Zellen/ml eingestellt.

Die Markierung mit ^{51}Cr (Fa. New England Nuclear, Massa- chusetts) erfolgte durch Aufnehmen dieser Zellzahl in 100 μl RPMI 1640 und Inkubation mit der gleichen Menge ^{51}Cr (100 μCi) über eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO_2 -Begasung).

Effektorzellen (effectors)

Die Milzzellen wurden, wie unter 3.1.6.1. beschrieben, vorbereitet, nach Trypanblaufärbung auf $5 \cdot 10^6$ lebende Zellen/ml Medium (RPMI 1640) eingestellt und in Plastik- kulturgefäßen über 18 Stunden bei 37°C in einem CO_2 -

Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit den nicht adhärenenten Milzzellen in Mikrotiterplatten ein 16- oder 20-Stunden-Chromium 51-Freisetzungstest durchgeführt.

Die Effektorzellen wurden entweder in vivo 24 Stunden vor der Milzzellpräparation durch intraperitonäale Verabreichung von 0,2 ml der Testsubstanz oder in vitro 2 Stunden vor Zugabe der Zielzellen durch 10 µl der Testsubstanz stimuliert.

Testdurchführung

Serienmäßige Zweierverdünnungen (100 µl) der Effektorzellen ($5 \cdot 10^6$ /ml) wurden in identischen Triplets gegen $5 \cdot 10^4$ /ml ^{51}Cr -markierte Zielzellen in einem Gesamtvolumen von 200 µl in Mikrotiterplatten (U-Form, Fa. Nunc) auf ihre zytolytische Aktivität getestet. Die Inkubationszeiten betragen 16 oder 20 Stunden.

Danach wurden die Platten 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und 100 µl Überstand aus jeder Vertiefung abpipettiert.

Die γ -Strahlung des freigesetzten Chroms wurde in einem γ -Counter 1179 der Fa. Searle Analytic Inc. gemessen.

Die maximal mögliche ^{51}Cr -Freisetzung (maximal release, mr) wurde durch Behandlung von 100 µl Zielzellen mit 100 µl Triton (5% in aqua dest.) erreicht.

Die spontane Freisetzung von ^{51}Cr durch die Zielzellen (spontaneous release, sr) wurde durch die Inkubation von Zielzellen nur in Medium (200 µl RPMI 1640 Gesamtvolumen/Plattenvertiefung) ermittelt.

Auswertung

Die Zytotoxizität wurde in % als Mittelwert von Dreieransätzen + der Standardabweichung nach folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ spezifische Lysis} = \frac{\text{Testcounts} - \text{Spontancounts}}{\text{Maximalcounts} - \text{Spontancounts}} \cdot 100$$

3.1.6.4. Untersuchung der Induzierbarkeit von Interferon über direkten und indirekten Interferon-nachweis durch den VSV-Plaque-Reduktionstest

Im Plaque-Reduktionstest (PRT) läßt sich die Interferon-induktion anhand der Hemmwirkung auf die Virusvermehrung in Zellkulturen nachweisen.

Der PRT kann als direkter und indirekter Test durchgeführt werden:

Im direkten PRT werden die zu untersuchenden Testsubstanzen selbst auf ihren Interferongehalt oder auf eine in vitro-Interferoninduktion hin untersucht.

Im indirekten PRT werden Serum-Interferon-negative Mäuse mit den Testsubstanzen behandelt, um dann im Serum zu bestimmten Zeiten nach der Behandlung in einem in vitro-Zellsystem in vivo gebildetes Interferon nachzuweisen.

Zellkultur

Verwendet wurden LTK-Zellen, eine permanente Mäusezell-Linie, Strain L, Fibroblasten-ähnlich, Herkunft Subcutis. Als Medium diente MEM (Dulbecco-Modifikation) mit 5% FCS. Die Zelleinsaat für den PRT betrug $6 \cdot 10^5$ /ml Medium.

Testvirus

Als Indikator wurde das Stomatitis Vesicularis Virus (VSV), Stamm Indiana, verwendet.

Die Vermehrung, Titrierung und Standardisierung erfolgte in embryonalen Hühnerfibroblasten-Kulturen (FHE), die Einstellung der Plaque-bildenden Einheiten wurde in LTK-Zellkulturen durchgeführt.

Tiermaterial

Die in vivo-Interferoninduktion wurde bei adulten, weiblichen NMRI-Mäusen (18-20 g schwer) versucht.

Testdurchführung

Die Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte 8 Stunden nach Verabreichung der Testsubstanzen bzw. Kontrollpräparate (0,2 ml i.p./Tier), da zu diesem Zeitpunkt die höchsten Interferon-Serumkonzentrationen zu erwarten sind. Das Testserum (jeweils von 5-10 Tieren gepoolt), die Testsubstanz selbst, sowie Serum unbehandelter Tiere und ein Serum von mit Poly-IC (IFN-Inducer, 100 µg/0,2 ml) behandelten Tieren wurden in Zweierpotenzen verdünnt und je 0,1 ml davon auf Zellkulturplatten mit dicht ausgewachsenen LTK-Zellen gebracht. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Testsubstanz- bzw. Serumverdünnungen abgesaugt, die Kulturen mit Medium gewaschen und anschließend mit je 0,1 ml einer VSV-Suspension beimpft, die auf ca. 30 Plaquebildende Einheiten eingestellt war.

Nach 1-stündiger Adsorption des Virus bei 37°C und Absaugen des Überstandes wurden die Kulturen mit Agar überschichtet, weitere 16 Stunden bei 37°C inkubiert, und dann mit 0,5 ml Neutralrot (0,01% in PBS) gefärbt.

Auswertung

Nach 24 Stunden Lagerung bei Zimmertemperatur wurden die durch die lokale Virusvermehrung und dadurch bedingte Zellzerstörung gebildeten sog. Plaques ausgezählt und ihre Anzahl (Mittelwert aus 4 Proben) in der jeweiligen Serum- bzw. Testsubstanzverdünnung mit den allein mit

Virus inkubierten Kontrollen verglichen.

Als Interferon-Titer gilt die Verdünnung, bei der durch Hemmung der Virusvermehrung, verglichen mit den Kontrollen, noch eine 50%ige Reduktion der Plaques erzielt wird.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Eignung der verschiedenen Zellkulturen für die Gewinnung nichtantigenspezifischer Mediatoren

Von den getesteten Zellkulturüberständen (ZKU) ließen sich nur in den von B-Hybridomas (KHLYK) gewonnenen Konzentraten, sowie in der mit PIND-ORF 8-PL stimulierten RAJI-Zellkultur (Rpo 1) paramunisierende Eigenschaften in beiden Infektionsbelastungsmodellen (VSV und AV) nachweisen.

In den nachfolgenden in vitro-Versuchen wurden deshalb nur Konzentrate aus diesen Effektorzellen eingehender untersucht.

3.2.2. Eignung der untersuchten Substanzen für die Stimulierung der Zellkulturen

Insgesamt wurden 8 Substanzen in den Stimulierungsversuchen eingesetzt. Signifikant infektionsschützende Eigenschaften bei den in vivo-Versuchen wiesen nur solche ZKU auf, die mit den viralen Paramunitäts-inducern PIND-ORF, bzw. in einigen Fällen PIND-AVI, stimuliert waren. LPS und Con A per se lösten zwar in vitro bei Lymphozytenstimulationstests eine hohe Lymphozytenproliferation aus, damit stimulierte ZKU hingegen vermittelten keinen Schutz gegen die VSV- bzw. AV-Infektion. Poly-IC induzierte bei Mäusen einen hohen Serum-IFN-Titer (Kontrollserum im PRT), konnte aber als Stimulans von RAJI-Zellen keine nachweisbare Sekretion von paramunisierenden Mediatoren bei den Zellkulturen auslösen. Tetanus-Toxoid erwies sich als ungeeignet für die Stimulierung von KHLYK-Zellkulturen.

3.2.3. Untersuchung über die homologe Wirksamkeit der Mediatoren in vivo

3.2.3.1. Infektionsbelastungsmodell "Babymaus" / VSV

Als Maß für die Wirksamkeit der konzentrierten Zellkulturüberstände (ZKÜ) galt die Reduktion der Mortalität nach einer Infektionsbelastung mit dem Stomatitis Vesicularis Virus (VSV).

Insgesamt wurden 11 VSV-Versuche durchgeführt, in denen 27 der hergestellten ZKÜ in ihrer Ausgangskonzentration z.T. mehrmals getestet wurden, wobei in keinem Fall Gewebsunverträglichkeiten nach der Applikation auftraten.

Von ZKÜ 1, 4 und 23 wurden zusätzlich Verdünnungsreihen angefertigt und ihre Dosis-Wirkungs-Relationen bestimmt (s.3.2.3.3.).

ZKÜ 23 wurde weiterhin nach unterschiedlicher Lagerungsdauer bei verschiedenen Lagertemperaturen geprüft (s.3.2.3.3.).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tabelle 17a : Wirksamkeit der ZKU im Infektionsmodell VSV

Versuch	ZKU* bzw. Kontrollsubstanz	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
1	15	2 /32	6	94
	NaCl-PP	30/30	100	-
2	10	15/30	50	50
	13	3 /30	10	90
	14	3 /30	10	90
	20K**	30/30	100	0
	NaCl-PP	30/30	100	-
3	1	3 /30	10	90
	19	11/30	36	64
	FCS	31/31	100	-
4	1	2 /31	6	94
	FCS	29/29	100	-
5	4	1 /30	3	97
	21K**	29/30	96	4
	NaCl-PP	29/29	100	-
6	6	5 /30	16	84
	11	3 /28	11	89
	FCS	28/28	100	-

* Herstellungsart siehe Tabelle 15

** Unstimulierte ZKU

Tabelle 17b : Wirksamkeit der ZKÜ im Infektionsmodell VSV

Versuch	ZKÜ* bzw. Kontrollsubstanz	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
7	23	3 /24	12	87
	NaCl-PP	28/30	93	-
8	A 1	11/16	68	0
	FCS	19/29	65	0
9	CA 1	31/31	100	0
	NaCl-PP	29/30	96	-
10	V 1	30/30	100	0
	L 1	29/31	93	0
	MM 1	30/30	100	0
	Rpo 2	30/30	100	0
	22K**	28/30	93	0
	NaCl-PP	29/31	93	-
11	BL 1	29/30	96	4
	BL 2	30/30	100	0
	BK 1	29/29	100	0
	BK 2	28/30	93	7
	T 1	30/30	100	0
	J 1	28/30	93	7
	J 2	29/30	96	4
	NaCl-PP	30/30	100	-

* Herstellungsart siehe Tabelle 15

** Unstimulierte ZKÜ

3.2.3.2. Infektionsbelastungsmodell Adulte Maus / AV

Analog dem VSV-Test galt auch im AV-Test die Reduktion der Mortalität nach einer Testinfektion mit AV als Maß für die paramunisierende Wirkung der ZKÜ.

In insgesamt 13 Belastungsversuchen wurden 33 der hergestellten ZKÜ unverdünnt an verschiedenen Applikationsorten wiederum teilweise mehrmals getestet, wobei auch hier in keinem Fall Gewebsunverträglichkeiten nach der Applikation auftraten (Ergebnisse siehe Tabelle 18).

Von ZKÜ 1, 4 und 23 wurden Verdünnungsreihen angefertigt und die Wirkung in den verschiedenen Konzentrationen getestet. ZKÜ 23 wurde zusätzlich nach verschiedenen Lagerungszeiten und Lagerungstemperaturen geprüft (s.3.2.3.3.).

Doppelbelastung

19 Tiere, die für den AV-Test Nr.2 mit ZKÜ 1 vorbehandelt waren und die Infektion schadlos überstanden hatten, wurden 14 Tage nach der ersten Infektionsbelastung ein zweites Mal mit derselben Menge des Belastungsvirus infiziert, ohne erneut mit ZKÜ vorbehandelt zu sein. Trotz im ELISA-Test ermittelter Antikörpertiter gegen AV (1:640, 14 Tage nach Erstinfektion) starben bei der Zweitbelastung alle Tiere des Versuchs.

Tabelle 18a : Wirksamkeit der ZKÜ im Infektionsmodell AV

Versuch	ZKÜ* bzw. Kontroll- substanz	Appl. Ort	Mortalität		Wirkungs- index
			absolut	in %	
1	2	i.p.	12/30	40	48
	NaCl-PP	i.p.	17/22	78	-
2	1	i.p.	1 /20	5	94
	17	i.p.	2 /20	10	89
	18	i.p.	8 /20	40	57
	20K**	i.p.	18/20	90	3
	NaCl-PP	i.p.	14/15	93	-
3	13	i.p.	2 /21	9	91
	14	i.p.	2 /20	10	89
	19	i.p.	3 /21	14	84
	FCS	i.p.	20/22	91	-
4	14	i.p.	4 /22	18	80
	15	i.p.	5 /22	23	74
	21K**	i.p.	20/22	91	0
	NaCl-PP	i.p.	20/22	91	-
5	10	i.p.	4 /17	12	86
	15	i.p.	4 /17	12	86
	15	s.c.	19/22	86	2
	FCS	i.p.	21/24	88	-

* Herstellungsart siehe Tabelle 15

** Unstimulierte ZKÜ

Tabelle 18b : Wirksamkeit der ZKÜ im Infektionsmodell AV

Versuch	ZKÜ* bzw. Kontroll- substanz	Appl. Ort	Mortalität		Wirkungs- index
			absolut	in %	
6	1	i.p.	2 /20	10	89
	NaCl-PP	i.p.	18/20	90	-
7	4	i.p.	1 /20	5	93
	6	i.p.	2 /20	10	87
	7	i.p.	9 /20	45	40
	8	i.p.	15/20	75	0
	9	i.p.	15/20	75	0
	10	i.p.	2 /20	10	87
	FCS	i.p.	18/24	75	-
8	4	i.v.	12/20	60	37
	21K**	i.v.	19/20	95	0
	NaCl-PP	i.p.	20/20	100	-
9	11	i.p.	1 /20	5	94
	23	i.p.	1 /20	5	94
	25	i.p.	11/20	55	39
	22K**	i.p.	18/20	90	0
	NaCl-PP	i.p.	18/20	90	-
10	5	i.p.	18/20	90	10
	22K**	s.c.	20/20	100	0
	FCS	i.p.	20/20	100	-

* Herstellungsart siehe Tabelle 15

** Unstimulierte ZKÜ

Tabelle 18c : Wirksamkeit der ZKÜ im Infektionsmodell AV

Versuch	ZKÜ* bzw. Kontroll- substanz	Appl. Ort	Mortalität		Wirkungs- index
			absolut	in %	
11	23	i.p.	3 /20	15	84
	23	s.c.	14/19	74	22
	23	i.v.	13/20	65	32
	A 1	i.p.	16/17	94	1
	V 1	i.p.	19/20	95	0
	L 1	i.p.	18/20	90	5
	Rpo 2	i.p.	17/20	85	10
	NaCl-PP	i.p.	19/20	95	-
12	26	i.p.	1 /20	5	95
	28	i.p.	19/20	95	0
	MM 2	i.p.	19/20	95	0
	NaCl-PP	i.p.	19/20	95	-
13	Rpo 1	i.p.	2 /20	10	89
	24	i.p.	2 /20	10	89
	Rpo O**	i.p.	19/20	95	0
	FCS	i.p.	19/20	95	-

* Herstellungsart siehe Tabelle 15

** Unstimulierter ZKÜ

3.2.3.3. Spezielle Untersuchungen mit Zellkultur- überständen und Placebos

Dosis-Wirkungsrelation, Wirkungseinheiten

Von ZKÜ 1, 4 und 23 wurden in Zweierpotenzen Verdünnungsreihen angefertigt und in den Infektionsbelastungsmodellen (VSV und AV) getestet (Tabellen 19, 20, 21), ferner wurden die Wirkungseinheiten pro ml Testsubstanz berechnet (Tabelle 22).

Die Dosis-Wirkungs-Relationen in beiden in vivo-Testen sind in den Abbildungen 3, 4 und 5 graphisch dargestellt.

Lagerungsstabilität

ZKÜ 23 wurde in verschiedenen Aggregatzuständen (lyophilisiert, tiefgefroren, flüssig) bei unterschiedlichen Lagertemperaturen (37°C, 20°C, 4°C, -20°C) über verschiedene Zeiträume (1, 4, 26 Wochen) aufbewahrt und schließlich auf ihre paramunisierende Wirkung in den Infektionsmodellen überprüft (Tabelle 23).

Einmalige Zellkultur-Stimulierung

Über die Wirkung von ZKÜ T1 mit T5 nach einmaliger Stimulierung und nachfolgender 10maliger Zellteilung ohne erneute Stimulation gibt Tabelle 24 Auskunft.

Placebos

Es wurde die Mortalität von Versuchstieren ermittelt, die mit verschiedenen Placebopräparaten (Herstellung bzw. Zusammensetzung siehe Tabelle 16) behandelt und dann einer Belastungsinfektion mit VSV bzw. AV ausgesetzt wurden (Tabelle 25).

Tabelle 19a : Wirksamkeit von ZKÜ 1 im Infektions-
belastungsmodell VSV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität		Wirkungs- index
	absolut	in %	
unverd.	2 /31	6	94
1:4	3 /30	10	90
1:8	8 /30	26	74
1:16	18/29	62	38
1:32	26/30	86	14
1:64	29/29	100	0
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	30/30	100	-

Tabelle 19b : Wirksamkeit von ZKÜ 1 im Infektions-
belastungsmodell AV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität		Wirkungs- index
	absolut	in %	
unverd.	0 /20	0	100
1:4	1 /20	5	94
1:8	2 /20	10	89
1:16	10/20	50	38
1:32	10/20	50	38
1:64	10/21	48	49
1:128	17/20	85	11
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	19/20	95	-

Abbildung 3 : Dosis - Wirkungsrelation von ZKÜ 1 in den Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV

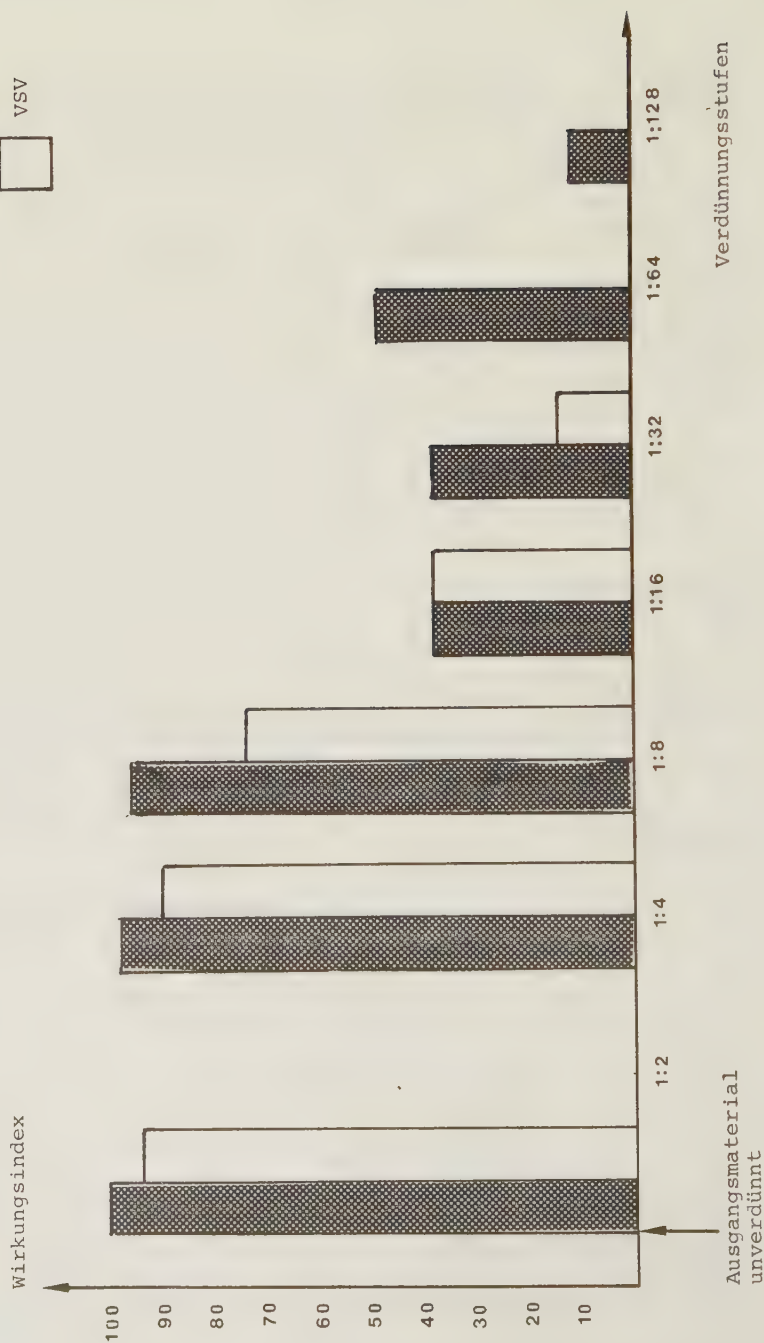


Tabelle 20a : Wirksamkeit von ZKÜ 4 im Infektions-
belastungsmodell VSV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
unverd.	1 /30	3	97
1:4	23/30	76	24
1:8	28/30	93	7
1:16	31/31	100	0
1:32	30/30	100	0
1:64	30/30	100	0
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	31/31	100	-

Tabelle 20b : Wirksamkeit von ZKÜ 4 im Infektions-
belastungsmodell AV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
unverd.	1 /20	5	93
1:4	4 /20	20	79
1:8	7 /21	33	65
1:16	10/21	48	49
1:32	16/21	76	20
1:64	18/20	90	5
1:128	19/20	95	0
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	19/20	95	-

Abbildung 4 : Dosis - Wirkungsrelation von ZKü 4 in den Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV

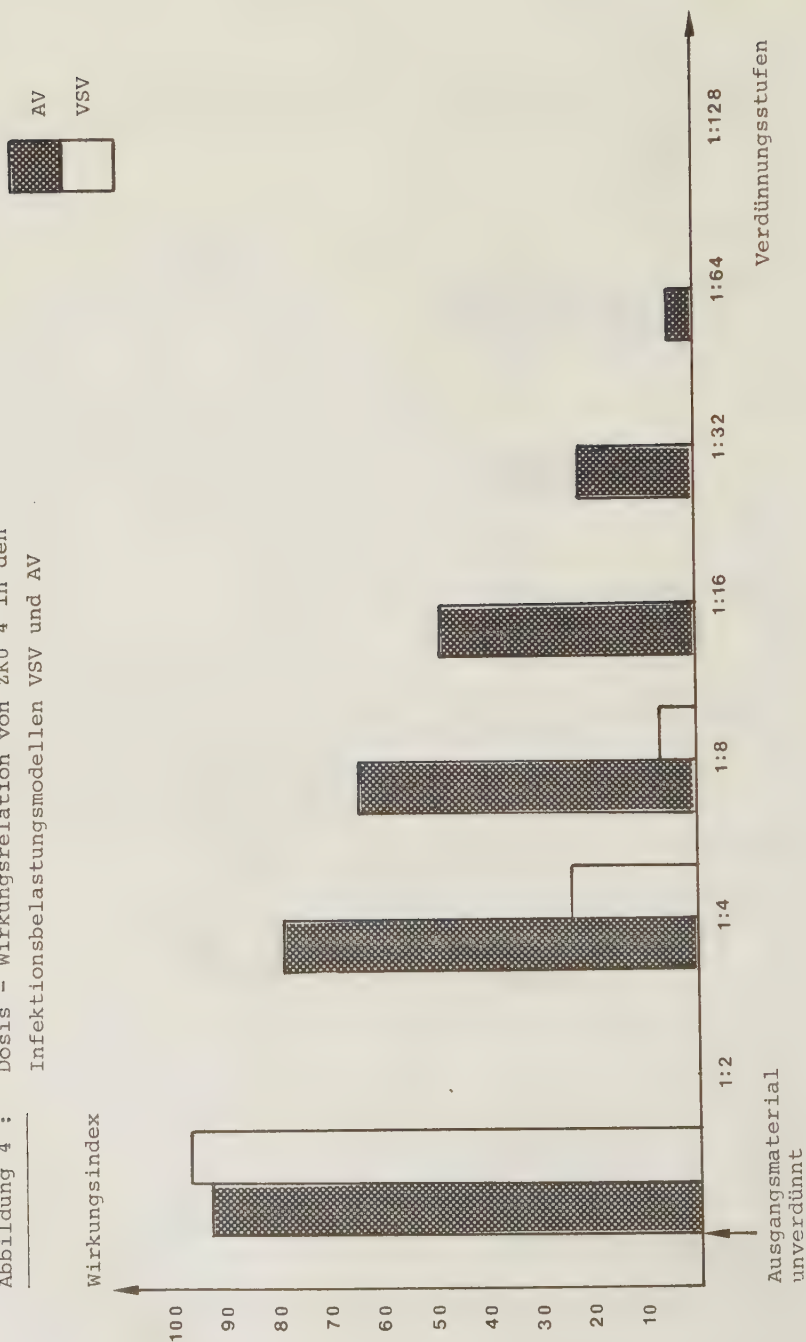


Tabelle 21a : Wirksamkeit von ZKÜ 23 im Infektions-
belastungsmodell VSV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
unverd.	3 /24	12	87
1:4	15/30	50	46
1:8	27/31	87	7
1:16	28/31	90	4
1:32	29/31	93	1
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	35/37	94	-

Tabelle 21b: Wirksamkeit von ZKÜ 23 im Infektions-
belastungsmodell AV (Verdünnungsreihe)

Verdünnung	Mortalität absolut	in %	Wirkungs- index
unverd.	1 /20	5	95
1:4	6 /20	30	70
1:8	10/20	50	50
1:16	13/19	68	32
1:32	17/20	85	15
1:64	18/20	90	10
1:128	19/20	95	5
Kontrollgruppe (NaCl-PP)	20/20	100	-

Abbildung 5 : Dosis - Wirkungsrelation von ZKÜ 23 in den Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV

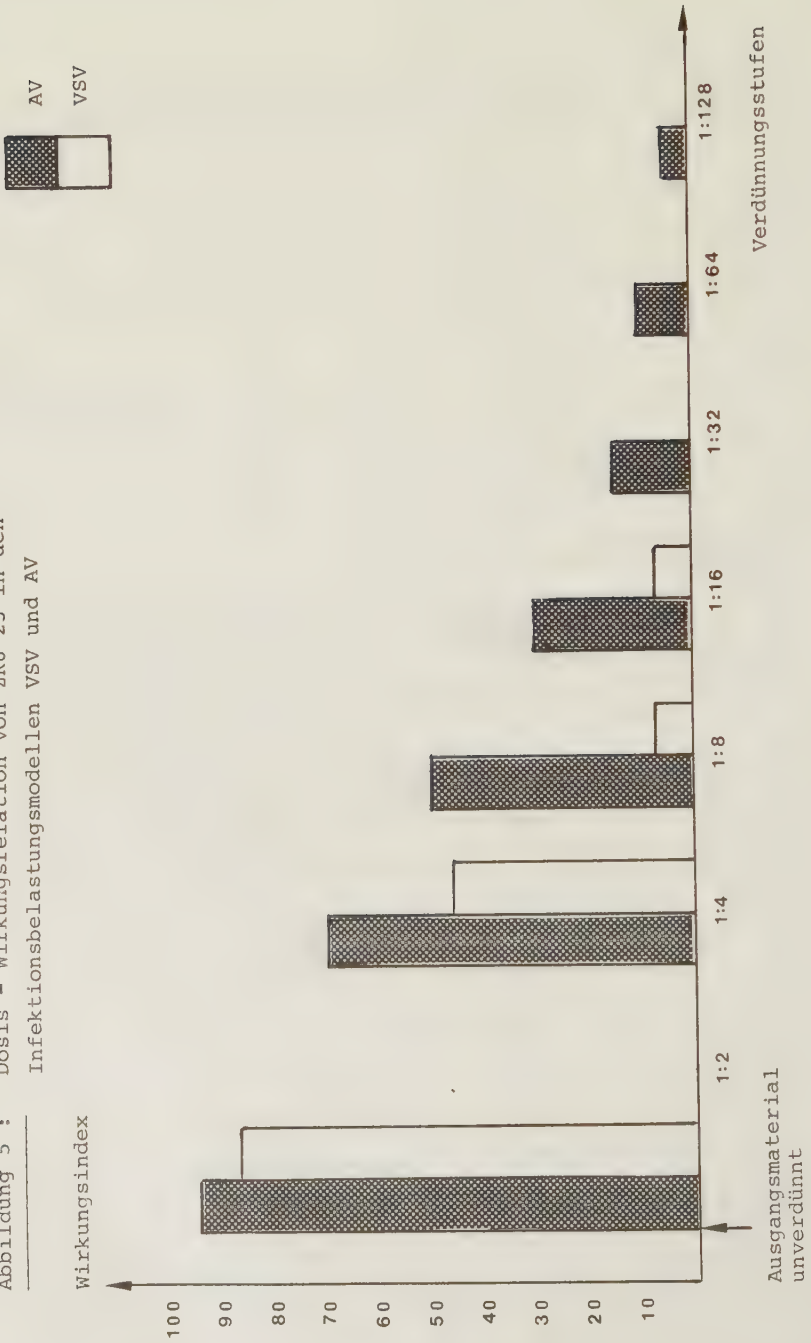


Tabelle 22 : Wirkungseinheiten (WE) pro ml unverdünnter
Ausgangssubstanz von ZKÜ 1,4 und 23 in den
Infektionsbelastungsmodellen VSV und AV

ZKÜ *	Wirkungseinheit / ml	
	V S V - Test	A V - Test
1	320	640
4	40	320
23	40	160

* Herstellung siehe Tabelle 15

Tabelle 23 : Lagerungsversuch: Stabilität von ZKÜ 23,
überprüft in den in vivo-Belastungsversuchen

Lagerdauer	Lagerungs- form	Temperatur	Wirkungsindex im	
			VSV-Test	AV-Test
1 Woche	flüssig	37°C	23	89
4 Wochen	flüssig	20°C	*	73
26 Wochen	flüssig	20°C	37	*
1 Woche	flüssig	4°C	87	94
26 Wochen	flüssig	4°C	34	69
26 Wochen	gefroren	-20°C	90	*
4 Wochen	lyophilisiert	-20°C	85	90
26 Wochen	lyophilisiert	-20°C	76	100

* nicht durchgeführt

Tabelle 24 : Wirkungsindices von ZKU T1-T5 nach einmaliger Stimulierung und nachfolgenden 10 Zellteilungen ohne erneute Stimulation

ZKU	Zell- teilungen	Inkubations- dauer nach Zellteilung	Wirkungsindex im	
			V S V-Test	A V-Test
T 1	0	48 h	50	90
T 2	2	48 h	40	70
T 3	5	48 h	0	*
T 4	7	48 h	0	*
T 5	10	48 h	0	*

* nicht durchgeführt

Tabelle 25 : Mortalität bei NMRI-Mäusen nach Behandlung mit Placebos und anschließender Infektionsbelastung mit VSV bzw. AV

Placebo *	Mortalität im		Mortalität im	
	V S V - Test absolut	in %	A V - Test absolut	in %
PO 1	30/30	100	19/20	95
PO 2	29/30	97	20/20	100
PO 3	29/31	94	15/21	71
PO 4	27/30	90	18/21	86
PO 5	29/30	97	19/20	95
PO 6	**		19/20	95

* Herstellung bzw. Zusammensetzung siehe Tabelle 16

** nicht durchgeführt

3.2.4. Untersuchungen über die homologe und hetero- loge Wirksamkeit der Mediatoren in vitro

3.2.4.1. Lymphozytenstimulation

8 ZKÜ, die sich im homologen System in vivo teilweise als wirksam erwiesen hatten, wurden in Lymphozytenstimulationstesten als Stimulierungssubstanzen eingesetzt.

Es wurde getestet, ob die ZKÜ in der Lage sind, Lymphozyten homologer Spender (Maus) und heterologer Spender (Mensch, Schwein) zur Proliferation anzuregen.

Positive Kontrollpräparate waren Phytohemagglutinin (PHA, Fa. Wellcome, Beckenham, England), Lipopolysaccharid (LPS, Fa. Difco, Detroit, USA) und in einem Versuch zusätzlich Pokeweed Mitogen (PWM, Fa. Serva, Heidelberg), Substanzen, die sich in früheren Versuchen als gute Lymphozyten-Stimulatoren erwiesen hatten (178).

In 4 Versuchen wurde mit Schweine-Lymphozyten gearbeitet, in je 2 mit Lymphozyten von Mensch und Maus.

Die meisten ZKÜ, die bei in vivo-Versuchen wirksam waren, stimulierten Lymphozyten verschiedener Spezies zur Proliferation, während nicht stimulierte ZKÜ (Kontrollen) keinen Effekt erzielen konnten.

Die höchsten Stimulationsindices wurden bei Schweine- und Mäuselymphozyten erreicht. Menschliche Lymphozyten, an denen nur wenige Substanzen getestet wurden, reagierten schwächer, Unterschiede zwischen in vivo wirksamen ZKÜ und Kontrollpräparaten wurden auch hier deutlich.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 26, 27 und 28 zusammengefaßt.

Tabelle 26a : Stimulationsindices (SI) von Schweinelymphozyten nach Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen

Test	Testsubstanz	cpm*	+ se	Stimulationsindex
1	Zellkontrolle	164	16	-
	PHA 2 µg/ml	18126	282	110,5
	PWM 2 µg/ml	20116	328	122,7
	LPS 2 mg/ml	797	39	4,9
	ZKÜ 4 unverd.	245	17	1,5
	1:8	225	12	1,4
	1:16	150	12	0
	ZKÜ 15 unverd.	314	19	1,9
	1:10	272	10	1,7
	1:100	225	9	1,4
	ZKÜ 23 unverd.	246	13	1,5
	1:8	119	5	0
	1:16	110	4	0
	ZKÜ 20K** unverd.	81	9	0
	1:8	64	5	0
	1:16	48	6	0
2	Zellkontrolle	174	5	-
	PHA 1 µg/ml	13595	320	78,1
	LPS 2 µg/ml	389	14	2,2
	ZKÜ 23 unverd.	1830	41	10,6
	1:2	630	20	3,6
	1:4	179	3	1,0
	1:8	134	14	0

* counts per minute

** unstimulierter ZKÜ

Tabelle 26b : Stimulationsindices (SI) von Schweinelymphozyten nach Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen

Test	Testsubstanz	cpm*	+ se	Stimulations- index	
3	Zellkontrolle	84	9	-	
	PHA 2 µg/ml	2487	133	30,0	
	LPS 2 mg/ml	114	5	1,4	
	ZKÜ 10	176	10	2,1	
		1:8	99	5	1,1
	ZKÜ 23	unverd.	5121	161	62,0
		1:2	3796	48	45,7
		1:4	1149	69	17,4
		1:8	725	39	8,7
4	Zellkontrolle	170	5	-	
	PHA 2 µg/ml	26022	501	153,0	
	PHA 50 µg/ml	23910	315	140,6	
	LPS 2 mg/ml	2510	166	14,8	
	PIND-ORF 002	179	13	1,0	
		1:50	137	14	0
		1:100	223	29	1,3
	ZKÜ 23	unverd.	1823	70	10,7
		1:2	902	37	5,3
		1:4	664	27	3,9
		1:8	405	29	2,4
	ZKÜ 22K**	unverd.	192	13	1,1
		1:2	163	8	0
		1:4	155	12	0
	ZKÜ L 1	unverd.	177	26	0
	ZKÜ V 1	unverd.	48	7	0
	ZKÜ Rpo 1	unverd.	144	9	0

* counts per minute

** unstimulierter ZKÜ

Tabelle 27 : Stimulationsindices (SI) von Mäuselymphozyten
nach Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen

Test	Testsubstanz	cpm*	+ se	Stimulations- index	
1	Zellkontrolle	180	10	-	
	PHA 2 µg/ml	3292	60	18,3	
	LPS 2 mg/ml	684	14	3,8	
	ZKÜ 10	1:2	1482	62	8,2
		1:4	1447	22	8,0
		1:8	1448	73	8,0
		1:16	1782	78	9,9
	ZKÜ 23	1:2	2352	23	13,0
		1:4	1977	67	11,0
		1:8	1645	49	9,1
		1:16	1519	60	8,4
	ZKÜ 20K**	1:4	673	25	3,7
		1:8	1054	33	5,9
2	Zellkontrolle	802	26	-	
	PHA 2 µg/ml	1396	33	1,7	
	LPS 2 mg/ml	2026	76	2,5	
	PIND-AVI 029	1:2	38	2	0
		1:4	25	4	0
	PIND-ORF 002	1:2	20	2	0
		1:4	239	17	0
		1:8	618	57	0
	ZKÜ 23	unverd.	3247	78	4,0
		1:2	8751	216	10,9
		1:4	7837	165	9,8
		1:8	5698	168	7,1
	ZKÜ 20K**	unverd.	154	16	0
		1:2	337	28	0
	FCS		570	63	0

* counts per minute

** unstimulierter ZKÜ

Tabelle 28 : Stimulationsindices (SI) von humanen Lymphozyten nach Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen

Testsubstanz	Test 1		SI	Test 2		SI
	cpm*	+ se		cpm*	+ se	
Zellkontrolle	88	1	-	121	22	-
PHA 2 µg/ml	3588	112	40,8	4228	201	34,9
LPS 2 mg/ml	213	12	2,4	-	-	-
ZKÜ 23 unverd.	253	13	2,9	553	78	4,6
1:2	457	15	5,2	622	63	5,1
1:4	319	19	3,6	482	15	4,0
1:8	-	-	-	402	27	3,3
ZKÜ 22K**	-	-	-	135	34	1,1
1:4	-	-	-	102	47	0
1:8	-	-	-	109	33	0

* counts per minute

** unstimulierter ZKÜ

3.2.4.2. Phagozytose

2 Zellkulturüberstände, die sich bei in vivo-Versuchen als wirksam erwiesen hatten und 4 Placebopräparate, sowie PIND-ORF 002, PHA und LPS wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Phagozytoseeigenschaften peripherer Blutzellen von Schwein, Rind, Maus und Mensch zu beeinflussen.

Als Bewertungsgrundlagen dienten dabei der Phagozytose-Prozentsatz (PP) und der Phagozytose-Index (PI).

Der PP wies bei unbehandelten Proben verschiedener Spender zwar eine relativ weite Streuung auf, konnte aber mit einigen Testsubstanzen deutlich gesteigert werden.

Der PI wurde in keinem Fall durch die Testsubstanzen beeinflusst.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Tabelle 29a : Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit peripherer Blutzellen verschiedener Spezies durch Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen in vitro

Testsubstanz	Phagozytose-Prozentsatz (PP) und Phagozytose-Index (PI)							
	Schwein		Rind		Maus		Mensch	
	PP	PI	PP	PI	PP	PI	PP	PI
RPMI 1640	34	1,6	52	3,5	37	4,0	32	5,7
RPMI 1640	32	2,6	49	4,8	42	4,3	56	3,9
RPMI 1640	42	4,0	48	3,9	39	4,0	35	4,3
FCS	38	2,0	57	4,2	35	4,1	33	6,2
PIND-ORF 1:25	*	*	*	*	51	5,2	64	5,6
PHA 2 µg/ml	*	*	*	*	44	4,0	*	*
LPS 2 mg/ml	*	*	56	4,4	*	*	69	5,0
ZKÜ 10 1:4	43	2,2	45	1,4	*	*	*	*
1:16	40	2,4	75	3,9	*	*	*	*
ZKÜ 23 unverd.	76	3,3	*	*	68	5,2	*	*

* nicht durchgeführt

Tabelle 29b : Beeinflussung der Phagozytosefähigkeit peripherer Blutzellen
verschiedener Spezies durch Behandlung mit ZKÜ und Kontrollsubstanzen

Testsubstanz	Phagozytose-Prozentsatz (PP) und Phagozytose-Index (PI)					
	Schwein		Maus		Mensch	
	PP	PI	PP	PI	PP	PI
ZKÜ 23 unverd.	23	1,1	71	5,0	68	5,0
1:16	59	1,6	*	*	*	*
ZKÜ 23 unverd.	61	4,8	62	4,5	76	5,7
ZKÜ 23 unverd.	*	*	60	3,1	*	*
ZKÜ 22K** unverd.	39	4,2	45	3,9	62	5,5
ZKÜ 22K*** unverd.	*	*	44	5,2	*	*
ZKÜ 20K** unverd.	38	3,1	43	4,7	*	*

* nicht durchgeführt
** unstimulierte ZKÜ

3.2.4.3. Natürliche (spontane) Zytotoxizität

Die ZKÜ 1, 10 und 23, sowie als Vergleichssubstanzen PIND-ORF 002 und PIND-AVI 029, wurden bezüglich ihrer Fähigkeit, die spontane zellvermittelte Zytotoxizität zu stimulieren, untersucht.

Bewertet wurde die Veränderung der spezifischen Lysis von Zielzellen (Vero-Zellen) durch Effektorzellen (Mäusemilzzellen) nach Behandlung mit den Testsubstanzen (in vitro und/oder in vivo).

Die spezifische Lysis (SL) von Vero-Zielzellen durch Milzzellen unbehandelter Mäuse lag zwischen 1 und 5% (bei einem Effektor-Zielzellen-Verhältnis von 100:1).

Die SL der Zielzellen konnte sowohl durch in vitro- als auch in vivo-Behandlung mit ZKÜ 10 gesteigert werden. ZKÜ 23 erhöhte die SL bei in vivo-Anwendung nur unwesentlich, war aber in vitro gut wirksam. Die Paramunitätsinducer PIND-AVI und PIND-ORF erwiesen sich als gute NK-Zell-Stimulatoren (in vivo-Behandlung).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 zusammengefaßt.

Tabelle 30: Zytotoxizität von Milzzellen nach Behandlung
mit ZKÜ (Zielzellen: VERO)

Test- dauer	Test- substanz	Vorbehandlung der Effektorzellen	Spezifische Lysis bei Effektor-Zielzellen- verhältnis von		
			100:1	50:1	25:1
16 h	<u>ZKÜ 23</u> (unverd.)	in vivo 0,2 ml ip. 24 h vor Milz- präparation	7,9	6,9	0
	<u>ZKÜ 10</u> (unverd.)	in vivo 0,2 ml ip. 24 h vor Milz- präparation	36,3	2,0	.*
	<u>ZKÜ 10</u> (1:4)	in vitro 10 µl bei Zugabe der Ziel- zellen	31,2	5,5	.*
	<u>PIND-AVI</u> (unverd.)	in vivo 0,2 ml ip. 18 h vor Milz- präparation	22,8	14,7	14,3
20 h	<u>ZKÜ 1</u> (unverd.) (1:10)	in vivo 0,2 ml ip. 2 h vor Milz- präparation <u>und</u> in vitro 10 µl 6 h vor Zielzell-Zugabe	12,7	9,6	5,7
	<u>ZKÜ 23</u> (unverd.)	in vivo 0,2 ml ip. 24 h vor Milz- präparation	0,3	0	0
	<u>ZKÜ 23</u> (unverd.)	in vitro 10 µl bei Zugabe der Ziel- zellen	14,7	3,8	0
	<u>PIND-ORF</u> (unverd.)	in vivo 0,2 ml ip. 18 h vor Milz- präparation	20,0	16,4	13,1

* nicht durchgeführt

3.2.4.4. Interferon-Induktion

14 ZKÜ und die Kontrollsubstanzen FCS und Poly-IC wurden auf ihren Interferon (IFN)-Gehalt und auf ihre Fähigkeit, im in vitro-Zellsystem IFN zu induzieren, untersucht, wobei keine Substanz eine Reduzierung der Virus-Plaques bewirkte (direkter Plaque-Reduktionstest, PRT).

7 Seren in vivo ZKÜ-behandelter Mäuse wurden im indirekten PRT 8 Stunden nach der ZKÜ-Applikation überprüft, wobei mit 4 Seren die Virusvermehrung teilweise erheblich vermindert werden konnte (Plaque-Reduktion), 3 Seren zeigten keine Hemmwirkung auf das Testvirus.

In vivo Poly-IC behandelte Tiere (100µg) hatten nach 8 Stunden die höchsten IFN-Konzentrationen im Serum, was eine Plaque-Reduzierung von 94% (Serumverdünnung 1:2) bzw. 90% (Serumverdünnung 1:4) zur Folge hatte. Durch eine in vivo-Behandlung mit FCS (0,2 ml i.p.) konnte kein IFN-Serumspiegel induziert werden.

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 31 ersichtlich.

Tabelle 31a : Hemmwirkung von Seren ZKÜ behandelter
NMRI-Mäuse im VSV-Plaque-Reduktionstest (PRT)

Testsubstanz	Serumverdünnung	Hemmung in % durch Serumzugabe*
ZKÜ 4	1:2	35
	1:4	23
	1:8 - 1:32	0
ZKÜ 11	1:2	87
	1:4	81
	1:8	71
	1:16	74
	1:32	69
	1:64	51
	1:128	27
ZKÜ 23	1:2	40
	1:4	26
	1:8 - 1:128	0
ZKÜ 15	1:2	23
	1:4	33
	1:8	13
	1:16 - 1:128	0
ZKÜ 21K**	1:2 - 1:128	0

* Serumgewinnung 8 Stunden nach der in vivo-Behandlung

** Unstimulierter ZKÜ

Tabelle 31b : Hemmwirkung von Seren ZKÜ behandelter
NMRI-Mäuse im VSV-Plaque-Reduktionstest (PRT)

Testsubstanz	Serumverdünnung	Hemmung in % durch Serumzugabe*
ZKÜ 1	1:2 - 1:128	0
ZKÜ 25	1:2 - 1:128	0
FCS	1:2 - 1:32	0
Poly-IC	1:2	94
	1:4	90

* Serumgewinnung 8 Stunden nach der in vivo-Behandlung

3.2.5. Nachweis der Mediatorenwirkung als Ursache der hervorgerufenen biologischen Effekte

3.2.5.1. Ausschluß einer Antikörperwirkung als Infektions- schutz

In den aus Hybridoma-Zellkulturen gewonnenen Überständen konnten keine Orf-Antikörper nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob ein Serum-Antikörpergehalt einen Schutz gegen die AV-Belastungsinfektion vermittelt, wurden die AV-Antikörpertiter von mit ZKÜ behandelten und damit gegen die Infektion geschützten Mäusen 14 Tage post infectionem mit dem ELISA-Test ermittelt. Tiere der Gruppen 1 und 2 wiesen einen IgG-Antikörpertiter von 1:640, die der Gruppe 3 einen Titer von 1:1000 auf. Bis zum 5. Tag p.i. konnte bei überlebenden Tieren kein AV-Antikörpertiter festgestellt werden, ebenso nicht bei unbehandelten Kontrolltieren, deren Seren als negative Kontrolle für den ELISA-Test dienten (background).

Tiere, die die Belastungsinfektion überlebt hatten, und bei denen ein starker Titeranstieg erfolgt war, wurden 14 Tage nach der ersten Belastung ohne erneute Behandlung mit ZKÜ ein zweites Mal mit AV infiziert. Dieses Mal starben alle Tiere des Versuchs zwischen dem 3. und 5. Tag post infectionem.

3.2.5.2. Überprüfung von Einzelkomponenten bei der ZKÜ-Herstellung als Wirksubstanz

In den verschiedenen Placebopräparaten (siehe Tabelle 16) wurden Einzelkomponenten der ZKÜ-Herstellung für sich allein getestet. Weder bei den in vivo-Belastungstesten

noch in den durchgeführten in vitro-Versuchen konnten die Kontrollpräparate bzw. Einzelkomponenten eine den fertigen ZKÜ vergleichbare Wirkung erzielen (siehe Tabelle 25).

3.2.5.3. Ausschluß der Stimulatorssubstanz PIND-ORF als Wirksubstanz

Der am häufigsten als Stimulatorssubstanz verwendete PIND-ORF induziert unverdünnt per se einen hohen Schutz gegen die Belastungsinfektionen (WI im VSV- und AV-Test 80-100).

Bei in vivo-Anwendung von PIND-ORF in der gleichen Konzentration, wie sie zur Zell-Stimulierung benützt wurde (1:100, $\approx$ dem Placebopräparat PO 4) erhöhte sich die Mortalität im VSV-Test von 5 auf 90%, im AV-Test von 10 auf 86%, verglichen mit dem unverdünnten Inducer (siehe Tabelle 25).

Nach Filtration von PIND-ORF durch einen 0,22 μ -Filter ($\approx$ dem Placebopräparat PO 6) und der dadurch erreichten Entfernung seiner wirksamen Bestandteile, der inaktivierten Viruspartikel, wurde im AV-Test kein Wirkungsindex mehr erzielt (WI vor Filtration: 95).

Das inaktivierte Inducervirus vermehrte sich wie erwartet in den stimulierten Zellkulturen nicht, was durch lichtmikroskopische Untersuchung überprüft wurde.

Daß die ZKÜ frei von Viruspartikel waren, zeigten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die negativen Ergebnisse der im Hinblick auf eventuelle Zellkultur-Infektiosität durchgeführten Titrationen der ZKÜ (BEL-Zellen, 3 Subpassagen).

4. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Nichtantigenspezifische Mediatoren (118, 209) erhöhen die Infektabwehr gegen bestimmte Bakterien und Pilze. Es war naheliegend zu untersuchen, wieweit derartige Mediatoren auch unspezifische Abwehrmechanismen gegenüber Virusinfektionen beeinflussen können.

Im Mittelpunkt unserer Arbeit stand dabei zunächst die Gewinnung von Mediatoren aus geeigneten Zellkulturen und anschließend die Frage nach deren in vivo-Wirksamkeit bei der unspezifischen Virusabwehr.

Nachfolgende in vitro-Teste sollten dann Hinweise darüber geben, welche zellulären Effektorsysteme möglicherweise an der in vivo erzielten Schutzwirkung beteiligt sein könnten. Quantitative Aussagen spielten dabei weniger eine Rolle als die Frage nach der heterologen Wirksamkeit der stimulierten Zellkulturüberstände (ZKÜ).

ZKÜ, die im Tierversuch gut paramunisierend wirkten, ließen sich nur aus lymphatischen Zellen (Hybridomas, Lymphomas) gewinnen, wobei diese Zellkulturen jeweils mit viralen Paramunitätsinducern stimuliert waren. Bereits in früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß durch Virusstimulierung bestimmte Zellkulturen (hauptsächlich immunkompetentes Gewebe) nicht nur zur Interferonsynthese, sondern auch zur Bildung einer Reihe von anderen nichtantigenspezifischen Mediatoren angeregt werden (2, 154, 250).

Von der Inkubationsdauer nach Stimulierung (im Mittel ca. 36 h) blieb die Höhe der Wirkungsindices unbeeinflußt, genauso wenig wie die Ultrabeschallung einiger ZKÜ einen Effekt auf die Schutzwirkung in vivo ausübte. Lagerungsbedingte Wirkungsverluste traten nur bei den ZKÜ auf, die bei 20°C und 37°C aufbewahrt wurden, wobei offensichtlich

der biochemische Abbau der wirksamen Moleküle in diesem Temperaturbereich beschleunigt wird. Leider muß zur Bildung der für eine Schutzwirkung ausreichenden Menge an Mediatoren jede Zellkultur jeweils neu stimuliert werden. Bei sukzessiver Teilung einer stimulierten Zellkultur sanken die Schutzindices in vivo mit jeder Teilung. Offensichtlich wird der Reiz zur Abgabe von Mediatoren nicht auf die Tochterzellen weitergegeben.

Teilweise auftretende größere Wirkungsunterschiede von ZKÜ gleicher Herstellungsart lassen sich möglicherweise auf unterschiedliche Stimulierungsbedingungen wie Mediumzusammensetzung (z.B. Serumanteil) und Variationen im biologischen Material (Zellen, Versuchstiere, Belastungsvirus) zurückführen.

Die beiden Infektionsbelastungsmodelle VSV und AV unterscheiden sich in einigen Punkten grundsätzlich.

Zum einen verfügen die Versuchstiere im VSV-Test (juvenile, 2 Tage alte Mäuse) noch über kein voll ausgereiftes immunologisches Abwehrsystem, während es sich in den AV-Versuchen um erwachsene Mäuse handelt, deren Abwehrmechanismen vollständig ausgebildet sind.

Zum anderen unterschied sich die Vorbehandlung mit den Testsubstanzen, deren Applikation bei den Babymäusen immer subkutan, bei den adulten Tieren in den meisten Fällen intraperitonäal durchgeführt wurde.

Der dritte Unterschied betrifft die Art des Belastungsvirus: im VSV-Test wurde ein Rhabdovirus (RNS-Virus) und im AV-Test ein Herpesvirus (DNS-Virus) verwendet.

Daß gleiche ZKÜ bei Babymäusen teilweise schwächer wirksam waren, läßt sich durch die unterschiedliche Immunkompetenz der Versuchstiere erklären. Auch bei den in Dosis-Wirkungskurven ermittelten Werten fiel besonders bei den Babymäusen der schnelle Wirkungsabfall auf (Wirkungsverlust von 50%

bei einer Verdünnung von 1:4), der einen Hinweis darauf gibt, daß zur Erzielung einer Schutzwirkung eine relativ hohe Konzentration der Mediatoren nötig ist. Möglicherweise muß bei den Babymäusen die noch geringe Anzahl an abwehrkompetenten Zellen intensiver als bei älteren Tieren stimuliert werden, damit ein Infektionsschutz ausgebildet wird.

Eine weitere wichtige Rolle für die Schutzwirkung spielt der Applikationsort der ZKÜ, was besonders dadurch zum Ausdruck kommt, daß die intraperitonäale (i.p.) Verabreichung im AV-Test immer die höchsten Wirkungsindices (WI) brachte. Die subkutane und die intravenöse Applikation waren bedeutend weniger wirksam.

Möglicherweise liegt der hohen Schutzwirkung bei der i.p.-Anwendung die direkte Stimulierung der an der Virusabwehr beteiligten Effektorzellen des Peritonäums zugrunde. Bekannt ist auch, daß in der Abwehr von Herpesviren zellvermittelte Schutzmechanismen (z.B. Zytotoxische Makrophagen, Natural killer-Zellen oder O-Zellen) im Vordergrund stehen. Das könnte auch die Tatsache erklären, daß trotz hoher AV-Serum-Antikörpertiter Versuchstiere eine zweite Infektion mit AV nicht überlebten.

Anhand der Versuche mit verschiedenen Placebopräparaten ließ sich eindeutig klären, daß für die in vivo und in vitro auftretenden Wirkungen Mediatoren aus stimulierten Zellkulturen verantwortlich sind.

In vitro wurden Lymphozyten durch die ZKÜ durchwegs zur erhöhten Proliferation stimuliert, wobei eine speziesübergreifende Wirkung eindeutig festzustellen war. Möglicherweise ist dieser Effekt auf mitogene Faktoren in den Mediatorengemischen zurückzuführen.

Daß einige ZKÜ in vitro die spontane zellvermittelte Zytotoxizität erhöhten, kann mit einer Erklärung für die gute Schutzwirkung in vivo gegen das Aujeszky-Virus sein, bei dessen Abwehr vor allem zelluläre Mechanismen wirksam sind.

Die Induktion relativ hoher Interferon-Serumspiegel durch einige ZKU beweist; daß auch humorale Faktoren an der unspezifischen Virusabwehr beteiligt sind. Möglicherweise wird dadurch eine "Mediatoren-Kaskade" ausgelöst, die auf humoralem Weg die Verbindung zu zellulären Abwehrmechanismen (z.B. NK-Zellen oder Zytotoxische T-Lymphozyten) herstellt, eine Vorstellung, die im Einklang mit früheren Untersuchungen über Interleukin 2, Macrophage activating factor und Interferon-gamma steht (90, 92, 108).

Inwieweit die Phagozytose die unspezifische Infektabwehr in unseren Versuchen beeinflusste, konnte mit den in vitro durchgeführten Testen nicht eindeutig geklärt werden. Sicherlich spielen aber zytotoxische Makrophagen eine wichtige Rolle.

Aus allen diesen Wertungen der Ergebnisse läßt sich folgern, daß man mit nichtantigenspezifischen Mediatoren unspezifische Abwehrmechanismen des Organismus beeinflussen kann, die kurzzeitig einen Schutz in dem betreffenden Individuum aufbauen.

Zur Stimulierung der unspezifischen Infektabwehr stehen uns heute wirksame Paramunitätsinducer (PIND) zur Verfügung. Es liegt deshalb auf der Hand, darüber zu diskutieren, welchen Stimulatoren man in Zukunft für den Aufbau eines schnellen, erregerunspezifischen Schutzes den Vorzug geben soll, den Inducern oder den Mediatoren.

Mediatoren sind das Produkt stimulierter Effektorzellen. Sie sind in der Lage, bestimmte, für die Abwehr wichtige Zellsysteme zu aktivieren und dadurch in einem Organismus einen spezifischen oder unspezifischen Schutz zu erzeugen. Zum Aufbau eines kurzzeitigen, unspezifischen Schutzes (Paramunität) benutzt man heute mehr und mehr sogenannte Induktoren (Paramunitätsinducer). Die Entwicklung wirksamer und unschädlicher Inducer steht zwar

noch in den Anfängen, die faszinierenden Möglichkeiten der medikamentellen Stimulierung der unspezifischen Abwehr, d.h. der kurzfristige, schnelle Aufbau antiinfektiös wirkender Schutzmechanismen, wird jedoch bereits immer häufiger genutzt.

Die medikamentelle Verabreichung von Inducern stimuliert Effektorzellen, die Mediatoren freisetzen, über deren Wirkung es dann zur Ausbildung eines kurzzeitigen, unspezifischen Schutzes kommt. Es ist verständlich, zu versuchen, diesen unspezifischen Schutzzustand direkt über Mediatoren zu erreichen.

Die Herstellung solcher Mediatoren kann in geeigneten Zellkulturen erfolgen, die über Inducer-Stimulierung zur Bildung von Mediatoren angeregt wurden.

Die direkte Stimulierung entsprechender Abwehrmechanismen über Mediatoren aus Zellkulturen hätte entscheidende Vorteile. Die wesentlichsten sind:

1. Schnelle und gezielte, direkte Stimulierung der Zielzellen bzw. Zielmechanismen (z.B. endogene Interferon-Synthese, Erhöhung der NK-Aktivität oder Verstärkung der Phagozytose). Möglicherweise würde hierdurch zusätzlich ein Zeitgewinn gegenüber der Verabreichung von Inducern entstehen, da die Stimulierung der Effektorzellen und die Bildung der Mediatoren entfällt.

2. Das relativ niedrige Molekulargewicht der Mediatoren (unter 100 000 Dalton) erleichtert eine Reinigung und Anreicherung des rohen Mediatorenmaterials (Entfernung von unnötigen Ballaststoffen wie Proteine, Kohlehydrate, Lipide und sonstige Substanzen).

Im Gegensatz dazu bestehen die bisher gebräuchlichen Inducer aus komplexem biologischem Material (z.B. Vollbakterien bzw. deren Spaltprodukte, Bakterienextrakte, inaktivierte Viren usw.). Bei ihrer Verwendung werden dem Impfling neben den für die Stimulierung der Effektorzellen notwendigen Bestandteile eine Vielzahl anderer biologisch aktiver Stoffe einverleibt, bei Viren z.B.

Nucleinsäuren, über deren genetische Interaktionen im Organismus man immer unsicher ist.

3. Die Verabreichung gereinigter und konzentrierter Mediatorenpräparate würde die Sicherheit einer Prophylaxe oder Therapie erhöhen. Mögliche Sensibilisierungs- und Unverträglichkeitsphänomene könnten vermindert bzw. ausgeschaltet werden.

4. Eine Immunisierung, wie sie bei Verwendung von Inducern aus Viren oder Bakterien bei mehrmaliger Anwendung möglich sein kann, wäre bei Mediatoren nicht zu erwarten.

5. Die Stimulierung von Effektorzellen in einem Makroorganismus durch die Verimpfung von Inducern ist ein sehr variables Geschehen und immer abhängig vom Aktivitätszustand bzw. der Stimulierbarkeit der entsprechenden Effektorzellen. Nach dem Prinzip " ein Organ kann nur soviel leisten, wozu seine Effektorzellen in der Lage sind " wirkt sich die Paramunisierung mit Inducern deshalb von Individuum zu Individuum ganz unterschiedlich aus. Die Verabreichung von standardisierten Mediatoren könnte diesen Unsicherheitsfaktor teilweise ausschalten.

6. Mit der Herstellung von Mediatoren unter einheitlichen Laborbedingungen ließen sich Schwankungen im biologischen Material, wie sie bei der Herstellung z.B. von Virusinducern manchmal auftreten können (Probleme bei der Virusvermehrung, Gefahr einer Viruskontamination durch die verwendeten Organzellkulturen u.a.m.) auf ein Minimum reduzieren. Unter anderem könnte die Verwendung permanenter Zell-Linien eine Standardisierung der Mediatorproduktion ermöglichen, die in einem geschlossenen System (Großfermenter zur Zellproduktion, Gradienten-Zentrifuge zur Auftrennung und Reinigung etc.) weitgehendst von mikrobiellen Kontaminationen unbeeinflusst bliebe.

7. Die Stabilität von gereinigten Mediatorenpräparaten ist unter Umständen besser als von komplexen Inducern.

8. Aus einem Mediatorengemisch können gezielt über chemisch-physikalische Verfahren einzelne Mediatoren gewonnen werden, die z.B. nur die Interferon-Synthese oder nur die NK-Aktivität stimulieren. Hierdurch wäre eine selektive Erhöhung der körpereigenen Abwehr möglich und Rückkopplungs- bzw. Enhancement-Phänomene ließen sich dadurch vermeiden.

Bei all diesen Vorteilen von Mediatoren gegenüber Inducern fragt man sich natürlich, warum überhaupt noch darüber diskutiert wird, welche Stimulierungsart in Zukunft versucht werden soll. Dies ist aber aus folgenden Überlegungen notwendig:

1. Bei der Verwendung multipotenter Inducer werden über komplexe Vorgänge möglicherweise auch Abwehrsysteme stimuliert, die von Mediatoren nicht erreicht werden.
2. Eventuell sind Mediatoren, die durch Stimulierung mittels Inducer endogen vom Körper gebildet werden, wesentlich wirksamer und zum anderen unschädlicher. Am Beispiel der passiven und aktiven Interferonisierung läßt sich dies gut belegen: Exogen hergestelltes und verabreichtes Interferon (IFN) ist selbst in niedrigen Dosen pyrogen, toxisch und nur teilweise wirksam, während endogen gebildetes IFN (z.B. nach Inducer-Stimulierung) unschädlich ist und eine wichtige Funktion in der unspezifischen Abwehr einnimmt.

Neben all diesen Überlegungen kommen natürlich auch noch, speziell was die Tiermedizin anbetrifft, wirtschaftliche Überlegungen bei der Produktion von Inducern bzw. Mediatoren hinzu.

Unter denselben Laborbedingungen, bei denen derzeit Inducer u.a. zu Feldversuchszwecken hergestellt werden, ist die Mediatorengewinnung, bedingt durch die nötige Aufbereitung der geringen Mengen an Wirksubstanz, arbeitsintensiver und kostenaufwendiger (Benötigung großer Mengen Zellsuspension, teure Ultrafiltrationsmembranen mit relativ kurzer Brauch-

barkeitsdauer u.a.m.).

Bei möglicher Großproduktion von Mediatoren und unter Berücksichtigung der in Zukunft auch bei der Inducer-Herstellung notwendigen Reinigungsverfahren, wird eine Mediatorproduktion zum Zwecke der Paramunisierung möglicherweise aber kostengünstiger sein.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

Mit gereinigten, standardisierten Mediatoren stünde uns eine Gruppe biologisch aktiver Substanzen zur Verfügung, mit denen man gezielt in immunregulatorische und paramunisierende Mechanismen des Organismus eingreifen kann. Die weitere Entwicklung, Herstellung und biologische Prüfung solcher Mediatoren werden herausfordernde Aufgaben der Zukunft sein.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Zellkulturen verschiedener Zellarten wurden mit unterschiedlichen Stimulatorssubstanzen behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und technisch weiter aufbereitet. Mit den konzentrierten Zellkulturüberständen (ZKÜ) wurden Versuche in vivo und in vitro durchgeführt. ZKÜ, die aus murinen B-Hybridoma (KHLYK)- bzw. humanen Lymphoma (RAJI)-Kulturen nach Stimulierung mit dem Virusinducer PIND-ORF gewonnen wurden, steigerten bei Mäusen hauptsächlich nach intraperitonäaler Anwendung die unspezifische Infektabwehr. Dadurch war der überwiegende Teil der Versuchstiere gegen eine anschließende Testinfektion (Belastung) mit Vesicularis Stomatitis Virus (VSV) bzw. Augeszky Virus (AV) geschützt. In vivo wirksame ZKÜ stimulierten in vitro die Proliferation von Lymphozyten homologer und heterologer Spender. Mit einigen ZKÜ wurde die spontane zellvermittelte Zytotoxizität von Mäusemilzzellen gesteigert und nach intraperitonäaler Anwendung eine endogene Interferonbildung ausgelöst. Das Phagozyoseverhalten peripherer Blutzellen verschiedener Spezies konnten ZKÜ nur in geringem Maße beeinflussen.

Die Versuche weisen nach, daß bestimmte Zellarten unter Verwendung geeigneter Stimulatoren zur Sekretion nicht-antigenspezifischer Mediatoren angeregt werden können. Bei Mäusen wurden paramunisierende Eigenschaften dieser Substanzen nachgewiesen, deren Charakterisierung und weitere biologische Prüfung Aufgaben der Zukunft sein werden.

Im Literaturteil wird eine Übersicht über Nomenklatur, Zellherkunft und mögliche biologische Bedeutung der bekanntesten Mediatoren gegeben.

S U M M A R Y

Production of mediators by cell cultures for the induction of nonspecific host defense (paramunization)

Cell cultures of various cell types were treated with different stimulator substances. The cell culture supernatants were harvested and technically prepared. With the concentrated cell culture supernatants (CCS) biological tests were performed in vivo and in vitro.

CCS, derived especially from murine B-hybridomas (KHLVK) or human lymphomas (RAJI) after stimulation with the viral inducer PIND-ORF, triggered the nonspecific host defense in mice mainly after intraperitoneal application. Treated in this manner, the majority of the mice was protected against a following challenge with Vesicularis Stomatitis Virus (VSV) or Aujeszky Virus (AV).

In vitro, proliferation of lymphocytes from homologous and heterologous donors were stimulated by CCS effective in vivo. The spontaneous cell mediated cytotoxicity of mouse spleen cells was raised by several CCS and synthesis of endogenous interferon was triggered by intraperitoneal application. The phagocytosis of peripheral blood cells of various species was scarcely influenced by CCS.

It has been shown, that certain types of cells may be stimulated by appropriate substances to produce nonantigenspecific mediators.

In mice immunomodulating efficiency of CCS-mediators was proved, of which the characterization and further biological testing provides a task for the future.

In the literature section an overview is given on nomenclature, cell origin and possible biological roles of the most known mediators.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Aaskov, J.G. Assay of human lymphokines in vitro.
Anthony, H.M. Evidence for a migration stimulation
(1976) factor (MStF) which interferes with
 the macrophage migration inhibition
 assay
 Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 54:527
2. Abb, J. Morphological characteristics of
Abb, H. interferon-producing cells in human
Deinhardt, F. peripheral blood
(1982) in "Human Lymphokines" edt.by Khan, A.
 and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.: 147
3. Altmann, L.C. Chemotactic lymphokines: A review
(1978) in "Leukocyte chemotaxis" edt.by
 Gallin, J.I. and Quie, P.G., Raven Press
 N.Y.: 267
4. Ambrose, C.T. Regulation of the secondary antibody
(1969) response in vitro
 Enhancement by actinomycin D and
 inhibition by a macromolecular product
 of stimulated lymph node cultures
 J.Exp.Med. 130:1003
5. Amerding, D. Activation of T and B lymphocytes
Katz, D.H. in vitro
(1974) II. Biological and biochemical
 properties of an allogeneic effect
 factor (AEF) active in triggering
 specific B lymphocytes
 J.Exp.Med. 140:19
6. Asherson, G.L. Specific T suppressor cell products
Zembala, M. which affect contact sensitivity
(1978) in "The pharmacology of immunoregu-
 lation" edt.by Werner, G.H. and
 Floc'h, F., Acad.Press London: 196
7. Ashorn, R. Spontaneous production of leukocyte
Krohn, K. migration inhibitory factor (LIF)
(1982) by established human lymphoid cell
 lines
 in "Human Lymphokines" edt.by Khan, A,
 and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.: 219

8. Bach, F.H. Lymphocyte reactivity in vitro
 Alter, B.J. II. Soluble reconstituting factor
 Solliday, S. permitting response of purified
 Zoschke, D.C. lymphocytes
 Janis, M. Cell.Immunol. 1:219
 (1970)

9. Bakker, W.W. Lymphokines in sensitized rats
 Engelhart, J. I. Migration inhibitory factor(s) from
 Mulder, I. specifically stimulated thymocytes
 Hoedemaker, P.Y. in vitro
 (1975) Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.49:491

10. Bennett, B. Reactions in vivo and in vitro
 Bloom, B.R. produced by a soluble substance
 (1968) associated with delayed-type hyper-
 sensitivity
 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 59:756

11. Bendtzen, K. The production of heterologous anti-
 (1977) bodies to the human lymphokine:
 leukocyte migration inhibitory factor
 (LIF)
 Cell.Immunol. 29:382

12. Bernstein, I.D. Tumor immunity: Tumor suppression
 Thor, D.E. in vivo initiated by soluble products
 Zbar, B. of specifically stimulated lymphocytes
 Rapp, H.J. Science 172:729
 (1971)

13. Besedovsky, H.O. Lymphokine-containing supernatants
 Del Rey, A. from Con A-stimulated cells increase
 Sorkin, E. corticosterone blood levels
 (1981) J.Immunol. 126:385

14. Besedovsky, H.O. Neuroendocrine immunoregulatory
 Del Rey, A. circuits
 Sorkin, E. in "Advances in immunopharmacology 2"
 (1983) ed.by Hadden, J.W., Chedid, L., Dukor, P.,
 Spreafico, F., Willoughby, D.,
 Pergamon Press Oxford:457

15. Bigazzi, P.E. Production of lymphokine-like factors
 Cohen, S. by SV 40-infected cell cultures
 Ward, P.A. Fed.Proc. 33:640
 Yoshida, T. (1974)

16. Bigazzi, P.E. Production of lymphokine-like factors
 Yoshida, T. (cytokines) by Simian virus 40-infected
 Ward, P.A. and Simian virus 40-transformed cells
 Cohen, S. Am.J.Pathol.80:69
 (1975)

17. Bloom,B.R.
Bennett,B.
(1966) Mechanism of a rection in vitro associated with delayed-type hyper-sensitivity
Science 153:80
18. Bloom,B.R.
(1971) In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions
Adv.Immunol. 13:101
19. Bloom,B.R.
Shevach,E.
(1975) Requirement for T cells in the production of migration inhibitory factor
J.Exp.Med. 142:1306
20. Blyden,G.
Handschuhmacher,R.
(1977) Purification and properties of human lymphocyte activation factor (LAF)
J.Immunol. 118:1631
21. Bout,D.T.
Joseph,M.
David,J.
Capron,A.R.
(1981) In vitro killing of S.Mansoni schisto-somula by lymphokine activated mouse macrophages
J.Immunol. 127:1
22. Bøym,A.
(1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21,suppl.97
23. Brade,V.
(1980) Die Sekretion von Mediatoren der Entzündung und der antimikrobiellen Abwehr durch Makrophagen
Zbl.Bakt.Hyg. A 247:259
24. Braun,W.
Levy,H.B.
(1972) Interferon preparations as modifiers of immune responses
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 141:769
25. Bühler,H.P.
Blaser,K.
(1980) Production of hybridoma secreting monoclonale antibodies against lymphocyte activating factor (Interleukin 1)
Behring Inst.Mitt. 67:226
26. Bundschuh,G.
Schneeweiß,B.
(1976) "Immunologie"
Gustav Fischer Verlag Stuttgart:291
27. Calebaugh,D.L.
Paque,R.E.
(1974) A skin reactive factor elaborated from a human lymphoblastoid cell line (RPMI 1788)
Cell.Immunol. 11:286
28. Chen,D.M.
Di Sabato,G.
(1976) Further studies on the thymocyte stimulating factor
Cell. Immunol. 22:211

29. Chen,P.
Trummel,C.
Horton,J.
Baker,J.J.
Oppenheim,J.J.
(1976) Production of osteoclast activating factor by normal human peripheral blood rosetting and nonrosetting lymphocytes
Eur.J.Immunol. 6:732
30. Chervenick,P.A.
Lo Buglio,A.F.
(1972) Human blood monocytes:
Stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro
Science 178:164
31. Clausen,J.E.
(1971) Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium
Acta Allergol. 26:56
32. Cohen,M.C.
Zeschke,R.
Bigazzi,P.E.
Yoshida,T.
Cohen,S.
(1975) Mastocytoma cell migration in vitro: Inhibition by MIF-containing supernatants
J.Immunol. 114:1641
33. Cohen,S.
Ward,P.A.
(1971) In vitro and in vivo activity of a lymphocyte and immune complex-dependent chemotactic factor for eosinophils
J.Exp.Med. 133:133
34. Cohen,S.
Bigazzi,P.E.
Yoshida,T.
(1974) Similarities of T cell function in cell mediated immunity and antibody production
Cell.Immunol. 12:150
35. Cohen,S.
Fischer,B.
Yoshida,T.
Bettigole,R.E.
(1974) Serum migration-inhibitory activity in patients with lymphoproliferative diseases
N.Engl.J.Med. 290:882
36. Cohen,S.
(1980) Lymphokines in delayed hypersensitivity in "Immunology 80" ed.by Fougereau,M. and Dausset,J., Acad.Press N.Y.:860
37. Cohen,S.
Adelmann,N.
Yoshida,T.
(1980) Production of MIF by murine lymphocytes in "Biochemical characterization of lymphokines" ed.by de Weck,A.L., Kristensen,F.,Landy,M., Acad.Press N.Y.:47

38. Colley,D.G. Eosinophils and immune mechanisms
(1973) I. Eosinophil stimulation promoter
(ESP): A lymphokine induced by
specific antigen or phytohemagglutinin
J. Immunol. 110:1419
39. Cunningham,B.A. Structure and activities of lympho-
Sela,B. cyte mitogens
Yahara,I. in "Mitogens in immunobiology" ed.by
Edelman,G. Oppenheim,J.J. and Rosenstreich,D.L.,
(1976) Acad.Press N.Y.:13
40. David,J.R. Delayed hypersensitivity in vitro:
(1966) Its mediation by cell-free substances
formed by lymphoid cell-antigen
interaction
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 56:72
41. David,J.R. Cellular hypersensitivity and immunity.
David,R.A. Inhibition of macrophage migration
(1972) and the lymphocyte mediators
Prog.Allergy 16:300
42. David,J.R. Macrophage activation by lymphocyte
(1975) mediators
Fed.Proc. 34:1730
43. Douglas,G.N. Partial characterization of a T cell-
Rubin,A.S. derived factor that suppresses the
(1977) initiation of the humoral immune
response in vitro
Immunology 33:745
44. Dumonde,D.C. "Lymphokines": Non-antibody mediators
Woistencroft,R.A. of cellular immunity generated by
Panayi,G.S. lymphocyte activation
Matthew,M. Nature (London) 224:38
Morley,J.
Howson,W.T.
(1969)
45. Dumonde,D.C. Local and systemic administration
Pulley,M.S. of lymphokine in patients with
O' Connel,D. advanced cancer
Southcott,B.M. Int.J.Immunopharmacol. 2:190
Robinson,M.R.G.
Paradinas,F.J
Rigby,C.C.
Den Hollander,F.
Schuurs,A.
De Bruin,R.W.
(1980)

46. Dumonde,D.C. A histological study of intradermal
Pulley,M.S. and intralesional injection of
Paradinas,F.J. human lymphoid cell line lymphokine
Southcott,B.M. (LCL-LK) in patients with advanced
O'Connell,D. cancer
Robinson,M.R.G. in "Human Lymphokines" edt.by Khan,A.
Den Hollander,F. and Hill,N.O., Acad.Press N.Y.:665
(1982)

47. Dumonde,D.C. Lymphokines and the lymphoendothelial
Hamblin,A.S. system:
Kasp-Grochowska,L. An illustration of immunoregulatory
Pulley,M.S. integration
Wolstencroft,R.A. in "Immunoregulation" edt.by Fabris,N.
(1983) and Garaci,E., Plenum Press N.Y.:177

48. Dunn,P.A. Macrophage activation by lymphokine
Eaton,W.R. factors (MAF) as measured by phago-
Lopatkin,E. cytosis,metabolic products and tumor
Tyrer,H. cell cytotoxicity: Correlation of
McEntire,J.E. multiparameter functional assays
Papermaster,B.W. in "Human Lymphokines" edt.by Khan,A.
(1982) and Hill,N.O., Acad.Press N.Y.:67

49. Dutton,R.W. Is there evidence for a non antigen-
Falkoff,R. specific diffusable chemical mediator
Hirst,J.A. from the thymus-derived cell in the
Hoffmann,M. initiation of immune response ?
Kappler,J.W. Prog.Immunol. 1:355
Kettmann,J.R.
- Lesley,J.F.
Vann,D.
(1971)

50. Engvall,E. Enzyme-linked immunosorbent assay
Perlmann,P. (ELISA):
(1971) Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry 8:871

51. Epstein,L.B. Fluorescence-activated cell sorting of
Kreth,W.W. human T and B lymphocytes
Herzenberg,L.A. II. Identification of the cell type
(1974) responsible for interferon production
and cell proliferation in response to
mitogen
Cell.Immunol. 12:407

52. Farrar,J.J. Biochemical relationship of thymocyte
Simón,P.L. mitogenic factor and factors enhancing
Koopman,W.J. humoral and cell-mediated responses
Fuller-Bonar,J. J.Immunol. 121:1353
(1978)

53. Farrar, J.J. Interleukin 2-production by EL 4-
Fuller-Farrar, J. thymoma cells
Simon, P.L. Behring Inst.Mitt. 67:58
Hilfiker, M.L.
Farrar, W.L.
(1980)

54. Feldmann, M. Cell interactions in the immune
Basten, A. response in vitro
(1972) III. Specific collaboration across
a cell impermeable membrane
J.Exp.Med. 136:49

55. Fellenberg, von, R. "Kompedium der allgemeinen Immunologie"
(1978) Parey-Verlag Berlin-Hamburg: 75

56. Ferraris, V.A. Release of prostaglandin by mitogen-
De Rubertis, F.R. and antigen-stimulated leukocytes
(1974) in culture
J.Clin.Invest. 54:378

57. Flanagan, T. Production of macrophage inhibition
Yoshida, T. factors by virus-infected cell cultures
Cohen, S. Infect.Immun. 8:145
(1973)

58. Florentin, I. Production of migration inhibition
Bruley, M. factor (MIF) by humoral established
Belpomme, D. B type cell lines derived from normal
(1975) and malignant tissues:
Studies on some factors affecting
MIF release
Cell.Immunol. 17:285

59. Friedrich, W. Lymphokines
Lazary, S. I. Use of insoluble concanavalin A
Geczy, C. for the production of migration
De Weck, A.L. inhibitory factor in guinea pig
(1975) lymphocyte cultures
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 49:504

60. Gately, C.L. The molecular dimensions of mitogenic
Gately, M.K. factor from guinea pig lymph node cells
Mayer, M.M. J.Immunol. 114:10
(1975)

61. Gately, C.L. Separation of lymphocyte mitogen
Gately, M.K. from lymphotoxin and experiments
Mayer, M.M. on the production of lymphotoxin
(1976) by lymphoid cells stimulated with
the partially purified mitogen:
A possible amplification mechanism of
cellular immunity an allergy
J.Immunol. 116:669

62. Gately, M.K. Purification and characterization
Mayer, M.M. of lymphokines:
(1978) An approach to the study of molecular
 mechanisms of cell-mediated immunity
 Prog.Allergy 25:106
63. Geczy, C.L. Production and in vivo effect of
Friedrich, W. antibodies against guinea pig
De Weck, A.L. lymphokines
(1975) Cell.Immunol. 19:65
64. Geczy, C.L. Antibodies to guinea pig lymphokines.
Geczy, A.F. II. Suppression of delayed hyper-
De Weck, A.L. sensitivity reactions by "second
(1976) generation" goat antibodies against
 guinea pig lymphokines
 J.Immunol. 117:66
65. Geczy, C.L. Antibodies to guinea pig lymphokines.
Geczy, A.F. IV. Suppression of the mixed leukocyte
De Weck, A.L. culture reaction by anti-lymphokine
(1976) globulin
 J.Immunol. 117:1824
66. Geczy, C.L. Characterization of guinea pig mito-
(1977) genic factors.
 I. Evidence that antigen-induced
 mitogenic factor and mitogenic factor
 from mixed leukocyte cultures are
 distinct molecular entities
 J.Immunol. 119:2107
67. Geha, R.S. Human lymphocyte mitogenic factor:
Merler, E. Synthesis by sensitized thymus-
(1974) derived lymphocytes, dependence of
 expression on the presence of antigen
 Cell.Immunol. 10:86
68. George, M. In vitro cell migration as a model
Vaughan, J.H. for delayed hypersensitivity
(1962) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111:514
69. Gillis, S. T cell growth factor:
Fern, M. Parameters of production and a
Ou, W. quantitative microassay for activity
Smith, K.A. J.Immunol. 120:2027
(1978)
70. Gillis, S. Interleukin 2: Biology and Biochemistry
(1983) J.Clin.Immunol. 3:1

71. Goetzl, E.J.
Austen, K.F.
(1972) A neutrophil immobilizing factor
derived from human leukocytes
J.Exp.Med. 136:1564
72. Goldstein, A.L.
Chirigos, M.A.
(1981) "Lymphokines and thymic factors
and their potential utilization
in cancer therapeutics"
Raven Press N.Y.
73. Goodman, M.G.
Chenoweth, D.E.
Weigle, W.O.
(1982) Induction of interleukin 1 secretion
and enhancement of humoral immunity
by binding of human C5a to macrophage
surface C5a receptors
J.Exp.Med. 156:912
74. Gordon, D.M.
Brag, M.A.
Morley, T.
(1976) Control of lymphokine secretion
by prostaglandins
Nature (London) 262:401
75. Granger, G.A.
Williams, T.W.
(1968) Lymphocyte cytotoxicity in vitro:
Activation and release of a
cytotoxic factor
Nature (London) 218:1253
76. Granger, G.A.
Moore, G.E.
White, J.G.
Matzinger, P.
Sundsmo, J.S.
Shupe, S.
Kolb, W.P.
Kramer, J.
Glade, P.R.
(1970) Production of lymphotoxin and
migration inhibitory factor
by established human lymphocytic
cell line
J.Immunol. 104:1476
77. Green, B.M.
Colley, D.G.
(1976) Eosinophils and immune mechanisms
II. Production of the eosinophil
stimulation promoter by mouse
T lymphocytes
J.Immunol. 116:1078
78. Green, J.A.
Cooperband, S.R.
Rutstein, J.A.
Kibrick, S.
(1970) Inhibition of target cell prolifera-
tion by supernatants from cultures
of human peripheral lymphocytes
J.Immunol. 105:48
79. Green, S.S.
Wistar, R.
(1976) Characterization of lymphocyte
inhibition by supernatants of crowded
lymphocyto blasts
J.Immunol. 117:1429

90. Hefeneider, S.H.
Henney, C.S.
Gillis, S.
(1982) In vivo interleukin-2-induced augmentation of natural killer cell activity
V.Regulation of cytotoxic activity in "NK cells and other natural effector cells", Acad.Press N.Y.
91. Henle, G.
Henle, W.
(1965) Evidence for a persistent viral infection in a cell line derived from Burkitt's Lymphoma
J.Bacteriol. 89:252
92. Henney, C.S.
Kern, E.D.
Gillis, S.
(1982) Cytotoxic responses: The regulatory influence of interleukin 2
Transplantation Proceedings XIV:565
93. Henney, C.S.
Kuribayashi, K.
Kern, D.E.
Gillis, S.
(1981) Interleukin-2 augments natural killer cell activity
Nature (London) 291:335
94. Herling, A.
Monreal, G.
Von Bülow, V.
(1981) Standardisierung eines indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Hühner-Bronchitisvirus
Zbl.Vet.Med. B 28:693
95. Hersh, E.M.
Drewinko, B.
(1974) Specific inhibition of lymphocyte blastogenic response to mitogens by a factor produced by cultured lymphoma cells
Cancer Res. 34:215
96. Higuchi, M.
Asada, M.
Kobayashi, Y.
Osawa, T.
(1983) Human T cell hybridoma producing migration inhibitory factor and macrophage activating factor
Cell.Immunol. 78:257
97. Hoffmann, M.K.
Watson, J.
(1979) Helper T cell-replacing factors secreted by thymus-derived cells and macrophages: Cellular requirements for B cell activation and synergistic properties
J.Immunol. 122:1371
98. Hoffmann, P.M.
Hanes, D.M.
Horsman, T.
Leimo, M.
Fudenberg, H.H.
(1977) Leukocyte migration in guinea pigs II. Partial characterization of a leukocyte migration inhibitory factor distinct from macrophage migration inhibitory factor
Cell.Immunol. 30:92

99. Horton,J.E. Bone resorbing activity in super-
Raisz,L.G. natant fluid from cultured human
Simmons,H.A. peripheral leukocytes
Oppenheim,J.J. Science 177:793
Mergenhausen,S.E.
(1972)
100. Horton,J.E. Macrophage-lymphocyte synergy in
Oppenheim,J.J. the production of osteoclast
Mergenhausen,S.E. activating factor
Raisz,L.G. J.Immunol. 113:1278
(1974)
101. Horton,J.E. Partial purification of a bone-
Koopman,W.J. resorbing factor elaborated from
Farrar,J.J. human allogeneic cultures
Fuller-Bonar,J. Cell.Immunol.43:1
Mergenhausen,S.E.
(1979)
102. Huang,K.Y. Enhancement of phagocytosis by
Donahoe,R.M. interferon-containing preparations
Gordon,F.B. Infect.Immun. 4:581
Dressler,H.R.
(1971)
103. Ihle,J.N. Interleukin-3:Biochemical and biolo-
Lee,J.C. gical properties and possible roles
Hapel,A.J. in the regulation of immune responses
(1982) Lymphokines 6:239
104. Ihle,J.N. Biologic properties of homogenous
Keller,J. interleukin 3
Oroszlan,S. I. Demonstration of WEHI-3 growth
Henderson,L.E. factor activity, mast cell growth
Copeland,T.D. factor activity, P cell stimulating
Fitch,F. factor activity, colony stimulating
Prystowsky,M.P. factor activity, and histamin pro-
Goldwasser,E. ducing cell stimulating factor
Schrader,J.W. activity
Pakaszynski,E. J.Immunol. 131:282
Dy,M.
Lebel,B.
(1983)
105. Jacobson,E.B. In vitro studies of allotype
(1973) suppression in mice
Eur.J.Immunol. 3:619
106. Janis,M. Potentiation of in vitro lymphocyte
Bach,F.H. reactivity
(1970) Nature (London) 225:238

107. Jones, M.C. Interferon activates macrophages
Varesio, L. to produce plasminogen activator
Herbermann, R.B. in "Human Lymphokines" ed. by Khan, A.
(1983) and Hill, N.O., Acad. Press N.Y.:9

108. Kawase, I. Interleukin-2 induces γ -Interferon
Brooks, C.G. production:
Kuribayashi, K. Participation of macrophages and
Olabuenaga, S. NK-like cells
Newman, W. J. Immunol. 131:288
Gillis, S.
Henney, S.
(1983)

109. Kees, U. Multiple lymphokine production from
Hültner, L. a T cell growth factor (TCGF)
Lohmann-Matthes, M. dependent lymphocyte clone in long
Marcucci, F. term culture
Staber, F. Immunobiol. 160:54
Krammer, P.H.
(1981)

110. Khan, A. Pre-clinical and phase 1 clinical
Hill, N.O. trials with lymphotoxin
Ridgway, H. in "Human Lymphokines" ed. by Khan, A.
Webb, K. and Hill, N.O., Acad. Press N.Y.:621
(1982)

111. Kniep, E.M. Partial purification and chemical
Domzig, W. characterization of macrophage
Lohmann-Matthes, M. cytotoxicity factor (MCF, MAF) and
Kickhöfen, B. its separation from migration in-
(1981) hibitory factor (MIF)
J. Immunol. 127:417

112. Knoop, J. Interferon inhibits the suppressor
Stremmer, R. T cell response of delayed-type
Neumann, C. hypersensitivity
De Maeyer, E. Nature (London) 296:757
Macher, E.
(1982)

113. Knox, A.J. Demonstration of the production
Von Westorp, C. of human thyroid-stimulating immun-
Row, V.V. globulin (HTSI) by Graves' lympho-
Volpe, R. cytes cultured in vitro with
(1976) phytohemagglutinin (PHA)
Metabolism 25:1217

114. Kontiainen, S. Suppressor cell induction in vitro
Feldman, M. III. Antigen-specific suppression
(1977) by supernatants of suppressor cells
Eur. J. Immunol. 7:310

115. Koopman, W.J. Interaction of soluble C3 fragments
Sandberg, A.L. with guinea pig lymphocytes.
Wahl, S.M. Comparison of effects of C3a, C3b,
Mergenhausen, S.E. C3c and C3d on lymphokine production
(1976) and lymphocyte proliferation
J.Immunol. 117:331

116. Krejci, J. Demonstration of migration inhibiting
Svejcar, J. substances in sera of guinea pigs
Pekarek, J. with delayed type hypersensitivity
Johanovsky, J. to ovalbumin influenced with systemic
(1968) antigen administration
Zeitschr.Immunitätsforschung 136:259

117. Lachman, L.B. Human interleukin 1: Purification
(1982) and properties
in "Human Lymphokines" edt.by Khan, A.
and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.:273

118. Lang, H. Protection of mice against tumor growth
Blumenstock, H. and bacterial infection by treatment
Lohmann-Matthes, M. with the lymphokine MCF (MAF)
(1981) Immunbiol. 160:64

119. Lavelle, K. Identification of a new platelet
Randsdell, A. aggregation factor released by
Trygstadt, C. sensitized leukocytes
(1975) Clin.Immunol.Immunopathol. 3:492

120. Lett-Brown, M.A. Chemotactic responses of normal
Boetcher, D.A. human basophils to C5a and to
Leonard, E.J. lymphocyte-derived chemotactic factor
(1976) J.Immunol. 117:246

121. Lindahl, P. Enhancement by interferon of the
Leary, P. specific cytotoxicity of sensitized
Gresser, I. lymphocytes
(1972) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69:721

122. Lindsay, P. The species specificity of interleukin-2
Schwulera, U. in "Human Lymphokines" edt.by Khan, A.
Sonneborn, H.H. and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.:479
(1982)

123. Littmann, B.H. Production of the second component
Ruddy, S. of complement by human monocytes:
(1977) Stimulation by antigen-activated
lymphocytes or lymphokines
J.Exp.Med. 145:1344

124. Littmann, B.H. Lymphokine stimulation of complement
(1980) component synthesis by human monocytes
in "Biochemical characterization of
lymphokines" edt.by de Weck, A.f.,
Kristensen, F., Landy, M., Acad.Press
N.Y.: 185

125. Lohmann-Matthes, M. Macrophage cytotoxicity factor
Ziegler, F.G. A product of in vitro sensitized
Fischer, H. thymus dependent cells
(1973) Eur. J. Immunol. 3:56
126. Lohmann-Matthes, M. Induction of macrophage-mediated
(1976) cytotoxicity
in "Immunobiology of the macrophage"
edt. by Nelson, D.S., Acad. Press N.Y.: 464
127. Lolekha, S. Macrophage aggregation in vitro:
Dray, S. A correlate of delayed hypersensitivity
Gotoff, S.P. J. Immunol. 104:296
(1970)
128. Lopatkin, D.E. "Regulatory mechanisms in lymphocyte
Ranney, D.F. activation" edt. by Lucas, D.O.,
(1977) Acad. Press N.Y.: 195
129. Luben, R.A. Use of in vitro immunization in
Mohler, M.A. production of monoclonal antibodies
(1980) against osteoclast activating factor:
A method with general applicability
to lymphokines
in "Biochemical characterization of
lymphokines" edt. by de Weck, A.L.,
Kristensen, F., Landy, M., Acad. Press
N.Y.: 55
130. Luger, T.A. Thymocyte proliferative activity
Stadler, B.M. produced by a keratinocyte cell line
Oppenheim, J.J. Immunobiol. 159:200
(1981)
131. Lykke, A.W. Thymic permeability factor: Its
Willoughby, D.A. relationship to lymph-node permeability
Kosche, E.R. factor and its antagonism by pyridinol
(1967) carbamate (anginin) and other anti-
inflammatory agents
J. Pathol. Bacteriol. 94:381
132. Mackler, B.F. Induction of lymphokine production
Altmann, L. by EAC and blastogenesis by soluble
Rosenstreich, D.L. mitogens during human B cell
Oppenheim, J.J. activation
(1974) Nature (London) 249:834
133. De Maeyer, E. Effects of interferon on sensitization
De Maeyer- and expression of delayed hypersensi-
Guignard, J. tivity in the mouse
(1980) in "Biochemical characterization of
lymphokines" edt. by de Weck, A.L.,
Kristensen, F., Landy, M., Acad. Press
N.Y.: 383

134. De Maeyer, E.
De Maeyer-
Guignard, J.
(1982) Immuno-modulating properties
of interferons
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 299:77
135. May-Levin, F.
Graffte, G.
Brule, G.
(1972) Utilisation de facteurs solubles
produits par les lymphocytes comme
méthode thérapeutique adjuvante
dans les tumeurs malignes métasta-
sées
Schweiz. Med. Wschr. 102:1188
136. Mayr, A.
Bachmann, P.A.
Bibrack, B.
Wittmann, G.
(1978) "Virologische Arbeitsmethoden I/II"
Fischer Verlag Stuttgart
137. Mayr, A.
(1978) Prämunität, Prämunisierung und
paraspezifische Wirkung von Schutz-
impfungen
Münchn. Med. Wschr. 120:239
138. Mayr, A.
(1979) Entwicklung neuer Immunisierungs-
und Paramunisierungsverfahren in
der Tiermedizin
Blaue Hefte 60:494
139. Mayr, A.
Raettig, H.
Stickl, H.
Alexander, M.
(1979) Paramunität, Paramunisierung,
Paramunitätsinducer
Teil I und II
Fortschr. Med. 97:1159, 1205
140. Mayr, A.
(1981) Induction of paramunitiy
in "Biological products for viral
diseases" edt. by Bachmann, P.A.
Taylor and Francis London:201
141. Mayr, A.
Herlyn, M.
Mahnelt, H.
Danco, A.
Zach, A.
Bostedt, H.
(1981) Bekämpfung des Ecthyma contagiosum
(Pustular dermatitis) der Schafe
mit einem neuen Parenteral-Zell-
kultur-Lebendimpfstoff
Zbl. Vet. Med. B, 28:535
142. Mayr, A.
(1982) Wissenschaftliche Entwicklung auf
dem Gebiet der medikamentösen
Steigerung der nichtantigenspezi-
fischen, körpereigenen Abwehr
Prakt. Tierarzt 63:329
143. Mayr, A.
(1982) Paramunität und Paramunisierung
Zbl. Vet. Med. B 29:5

144. Meltzer, M.S.
Wahl, L.M.
Leonhard, E.J.
(1980)
Macrophage activation by lymphokines: characterization of lymphokine signals for tumoricidal and microbiocidal activities and for prostaglandin synthesis in "Biochemical characterization of lymphokines" ed. by de Weck, A.L., Kristensen, F., Landy, M., Acad. Press N.Y.:161
145. Metcalf, D.
Moore, M.A.S.
Warner, N.L.
(1969)
Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells
J.Natl.Cancer Inst. 43:983
146. Metcalf, D.
(1974)
Depressed response of the granulocyte-macrophage system to bacterial antigens following preimmunization
Immunology 26:1115
147. Metcalf, D.
(1979)
Production of colony stimulating factors by lymphoid tissues in "Biology of the lymphokines" ed. by Cohen, S., Pick, E., Oppenheim, J.J., Acad. Press N.Y.:515
148. Mizel, S.B.
Oppenheim, J.J.
Rosenstreich, D.L.
(1978)
Characterization of lymphocyte activating factor (LAF) produced by a macrophage cell line P 388 D₁ II. Biochemical characterization of LAF induced by activated T cells and LPS
J.Immunol. 120:1504
149. Mochizuki, D.
Watson, J.
Gillis, S.
(1980)
Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules
IV. Purification of interleukin 2 from a murine T cell lymphoma
J.Immunol. 125:2579
150. Moore, M.A.S.
Williams, N.
Metcalf, D.
(1973)
In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: interaction between colony-forming and colony-stimulating cells
J.Natl.Cancer Inst. 50:591
151. Mota, L.
(1979)
Zellvermittelte Überempfindlichkeit in "Experimentelle und klinische Immunologie" ed. by Bier, O.G., Götze, D., Mota, I., Dias da Silva, W., Springer Verlag Berlin:188
152. Müller-
Brunecker, G.
(1983)
Vergleich der Wirkung von viralen Paramunitätsinducern, BCG und Levamisol auf das Wachstum eines strahleninduzierten Transplantat-Osteosarkoms bei der Maus
Vet.Med.Diss. München

153. Mundy, G.R. Bone-resorbing activity in
Luben, R.A. supernatants from lymphoid
Raisz, L.G. cell lines
Oppenheim, J.J. N.Engl.J.Med. 290:867
Buell, D.N.
(1974)
154. Nagarkatti, P.S. Evidence for the in vitro
D'Souza, M. production of migration inhi-
Rao, K.M. bition factor by sensitized
(1977) mouse spleen cells stimulated
with Dengue virus
Indian J.Exp.Biol. 16:10
155. Namba, Y. Regulatory substances produced
Waksman, B.H. by lymphocytes
(1975) I. Inhibitor of DNA synthesis
in the rat
Inflammation 1:5
156. Namba, Y. Regulatory substances produced
Waksman, B.H. by lymphocytes
(1976) III. Evidence that lymphotoxin
and proliferation inhibitory
factor are identical and dif-
ferent from the inhibitor of
DNA synthesis
J.Immunol. 116:1140
157. Namba, Y. Regulatory substances produced
Waksman, B.H. by lymphocytes
(1977) IV. Further characterization of
the inhibitor of DNA synthesis
Immunochemistry 14:143
158. Namba, Y. Regulatory substances produced
Jegasothy, B.V. by lymphocytes
Waksman, B.H. V. Production of inhibitor of
(1977) DNA synthesis (IDS) by proli-
ferating T lymphocytes
J.Immunol. 118:1379
159. Nathan, I. Immune (γ) interferon produced
Groopman, J.E. by a human T-lymphoblastoid cell
Quan, S.G. line
Bersch, N. Nature (London) 292:842
Golde, D.W.
(1981)
160. Nelson, D.S. The loss of macrophages from
Boyden, S.V. peritoneal exudates following the
(1963) injection of antigens into guinea
pigs with delayed-type hypersensi-
tivity
Immunology 6:264

161. Nelson,D.S.
North,R.J.
(1965) The fate of peritoneal macrophages after the injection of antigen into guinea pigs with delayed-type hypersensitivity
J.Lab.Invest. 14:89
162. Neville,M.E.
Lischner,H.W.
(1978) The role of the Fc region of IgG in the immune complex-stimulated production of a lymphokine by nonadherent human peripheral blood lymphocytes
Fed.Proc.Fed.Am.Soc.Exp.Biol.37:1362
163. Newman,W.
Gordon,J.
Hämmerling,U.
Senik,A.
Bloom,B.R.
(1978) Production of migration inhibition factor (MIF) and an inducer of plasminogen activator (IPA) by subsets of T cells in MLC
J.Immunol. 120:927
164. Not nominated
(1980) Interferon nomenclature
Nature (London) 286:110
165. Not nominated
(1979) Letter to the editor
Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors
J.Immunol. 123:2928
166. Northoff,H.
Hooks,J.J.
Jordan,G.
Oppenheim,J.J.
(1980) Direct correlation between the production of interleukin 2 (IL 2) and immune interferon (IF) by human mononuclear cells (MNL)
167. Oldham,R.K.
(1983) Biological response modifiers program
in "Advances in immunopharmacology 2" ed. by Hadden,J.W., Chedid,L.,Dukor,P.,Spreafico,F., Willoughby,D.,
Pergamon Press Oxford:655
168. Oppenheim,J.J.
Mizel,S.B.
Meltzer,M.S.
(1979) Biological effects of lymphocyte and macrophage-derived mitogenic "amplification" factors
in "Biology of the lymphokines" ed. by Cohen,S.,Pick,E.,Oppenheim,J.J.,
Acad.Press N.Y.:291
169. Oppenheim,J.J.
Rosenstreich,D.L.
(1976) Signals regulating in vitro activation of lymphocytes
Prog.Allergy 20:65

170. Otto, F. Lympozytenisolierung aus dem
Schmid, D.O. Blut des Menschen und der Tiere
(1970) Blut 21:118
171. Papageorgiou, P.S. Production and characterization
Henley, W.L. of migration inhibitory factor(s)
Glade, P.R. (MIF) of established lymphoid and
(1972) non-lymphoid cells
 J.Immunol. 108:494
172. Papageorgiou, P.S. Migration inhibitory factor (MIF)
Glade, P.R. production by skin fibroblast
(1974) cultures from patients with severe
 combined immunodeficiency
 Cell.Immunol. 12:326
173. Papageorgiou, P.S. Similaritiy of migration inhibitory
Sorokin, C.F. factor(s) produced by human lymphoid
Glade, P.R. cell line and phytohemagglutinin
(1974) and tuberculin-stimulated human
 peripheral lymphocytes
 J.Immunol. 112:675
174. Papermaster, B.W. Lymphokine properties of a lymphoid
Holtermann, O.A. cultured cell supernatant fraction
Klein, E. active in promoting tumor regression
Parmett, S. Clin.Immunol.Immunopathol. 5:48
Dobkin, D.
Landico, R.
Djerassi, J,
(1975)
175. Papermaster, B.W. Comment on in vivo effects of
(1980) lymphocyte culture supernatants
 in "Biochemical characterization
 of lymphokines" edt. by de Weck, A.L.,
 Kristensen, F., Landy, M.,
 Acad.Press N.Y.:605
176. Papermaster, B.W. Characterization of lymphotoxin
McEntire, J.E. and tumor inhibition properties
Gilliland, C.D. in a lymphokine preparation derived
Buchok, S.J. from the cultures mouse L 1210
Smith, M.E. lymphoma
(1980) in "Biochemical characterization
 of lymphokines" edt. by de Weck, A.L.,
 Kristensen, F., Landy, M.,
 Acad.Press N.Y.:193
177. Parker, J.W. Production of colony stimulating
Metcalf, D. factor in mitogen-stimulated
(1974) lymphocyte cultures
 J.Immunol. 112:502

178. Pawlas, S.
(1979) Untersuchungen zur Charakterisierung der Lymphozytenpopulation von Schwein und Rind
Vet.Med.Diss. München
179. Pfizemaier, K.
Röllinghoff, M.
Wagner, H.
(1980) Establishment of hybridomas producing interleukin 2
Behring Inst.Mitt. 67:68
180. Pfizemaier, K.
(1982) Interleukin-producing T cell hybridomas: a biological characterization of mediators controlling lymphocyte activation
Lymphokines 5:323
181. Pick, E.
Krejci, J.
Turk, J.L.
(1970) Release of skin reactive factor from guinea pig lymphocytes by mitogens
Nature (London) 225:236
182. Pick, E.
Brostoff, J.
Krejci, J.
Turk, J.L.
(1970) Interaction between "sensitized lymphocytes" and antigen in vitro. II. Mitogen-induced release of skin reactive and macrophage migration inhibitory factors
Cell.Immunol. 1:92
183. Pick, E.
(1977) Lymphokines: physiologic control and pharmacological modulation of their production and action in "Immunopharmacology" ed. by Hadden, J.W. and Coffey, R.G., Plenum Press N.Y.:163
184. Pick, E.
Cohen, S.
Oppenheim, J.J.
(1979) The lymphokine concept in "Biology of the lymphokines" ed. by Cohen, S., Pick, E., Oppenheim, J.J.
Acad.Press N.Y.:1
185. Pick, E.
(1979) Mechanisms of action of migration inhibitory lymphokines in "Biology of the lymphokines" ed. by Cohen, S., Pick, E., Oppenheim, J.J.,
Acad.Press N.Y.:59
186. Piessens, W.F.
Churchill, W.H.
David, J.R.
(1975) Macrophages activated in vitro by lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells
J.Immunol. 114:293
187. Piessens, W.F.
(1978) Increased binding of tumor cells by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators
Cell.Immunol. 35:303

188. Poste, G.
(1975) Production of a serine-protease
with macrophage migration inhibi-
tory factor activity by virus-
transformed cells and human tumor
cell lines
Cancer Res. 35:2558

189. Postlethwaite, A.
Kang, A.H.
(1976) Guinea pig lymphocyte-derived
macrophage aggregation factor:
its separation from macrophage
migration inhibitory factor
J.Immunol. 117:1651

190. Postlethwaite, A.
Snyderman, R.
Kang, A.H.
(1976) The chemotactic attraction of
human fibroblasts to a lympho-
cyte-derived factor
J.Exp.Med. 144:1188

191. Pulley, M.
Dumonde, D.C.
Carter, G.
Muller, B.
Fleck, A.
Southcott, B.M.
Den Hollander, F.
(1982) Hormonal, haematological and acute
phase protein responses of advanced
cancer patients to the intravenous
injection of lymphoid cell
lymphokine (LCL-LK)
in "Human Lymphokines" edt. by Khan, A.
and Hill, N.O.,
Acad.Press N.Y.:651

192. Ralph, P.
Broxmeyer, H.E.
Nakoinz, J.
(1977) Immunostimulators induce granulocyte-
macrophage colony-stimulating
activity and block proliferation
in a monocyte tumor cell line
J.Exp.Med. 146:611

193. Rich, A.R.
Lewis, M.R.
(1932) The nature of allergy in tuberculosis
as revealed by tissue culture studies
Bull.John Hopkins Hosp. 50:115

194. Rich, R.R.
Pierce, C.W.
(1974) Biological expressions of lymphocyte
activation
III. Suppression of plaque-forming
cell responses in vitro by super-
natant fluids from concanavalin A
activated spleen cell cultures
J.Immunol. 112:1360

195. Rich, S.S.
Rich, R.R.
(1975) Regulatory mechanisms in cell-media-
ted immune responses
II. A genetically restricted sup-
pressor of mixed lymphocyte reactions
by alloantigen activated spleen cells
J.Exp.Med. 142:1391

196. Roberts, W.K.
Vasil, A.
(1982) Evidence for the identity of murine
gamma interferon and macrophage
activating factor
J.Interferon Res. 2:519

197. Rocklin, R.E.
(1974) Products of activated lymphocytes:
Leukocyte inhibitory factor (LIF)
distinct from migration inhibitory
factor (MIF)
J.Immunol. 112:1461
198. Rocklin, R.E.
Chess, L.
MacDermott, R.P.
Schlossman, S.F.
David, J.R.
(1975) Studies on the production of MIF
and mitogenic factor using highly
purified human T and B lymphocytes
Immunol.Aspects Rheumatoid Arthritis
Rheumatology 6:98
199. Rocklin, R.E.
Bendtsen, K.
Greineder, D.
(1980) Mediators of immunity:
Lymphokines and monokines
Adv.Immunol. 29:5
200. Rodes, N.D.
McEntire, J.E.
Dunn, P.A.
Gay, C.
Decker, M.
Kardinal, C.G.
Gilliland, D.
Oxenhandler, R.W.
Papermaster, B.W.
(1982) Phase I clinical studies with lympho-
blastoid lymphokine preparations
from the RPMI 1788 cell line
in "Human Lymphokines" ed. by Khan, A.
and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.:699
201. Rook, A.H.
Masur, H.
Lane, C.
Frederick, W.
Kasahara, T.
Macher, A.M.
Djeu, J.Y.
Manischewitz, J.F.
Jackson, L.
Fauci, A.S.
Quinman, G.V.
(1983) Interleukin-2 enhances the depressed
natural killer and cytomegalovirus-
specific cytotoxic activities of
lymphocytes from patients with the
acquired immune deficiency syndrome
J.Clin.Invest. 72:398
202. Rosenstreich, D.L.
Wahl, S.M.
(1979) Cellular sources of lymphokines
in "Biology of the lymphokines" ed.
by Cohen, S., Pick, E., Oppenheim, J.J.,
Acad.Press N.Y.:209.
203. Rosenszajn, L.A.
Zeevi, A.
Goldman, I.
Sredni, B.
(1980) Characterization of monocyte and
lymphocyte mediators modulating
T lymphocyte colony formation
in "Biochemical characterization
of lymphokines" ed. by de Weck, A.L.,
Kristensen, F., Landy, M., Acad.Press
N.Y.:261

204. Rubin,A.S.
Coons,A.H.
(1972) Specific heterologous enhancement of immune response
III. Partial characterization of supernatant material with enhancing activity
J.Immunol. 108:1597
205. Rubinstein,M.
(1982) Purification and structural analysis of interferon
Phil.Trans.R.Soc.Lond.B. 299:39
206. Ruddle,N.H.
Waksman,B.H.
(1968) Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity
J.Exp.Med. 128:1267
207. Saddlick,J.R.
Hadden,E.M.
Hadden,J.W.
(1983) Lymphokine induced macrophage proliferation:
Purification and characterization of antigen induced MGF/CSF
in "Advances in immunopharmacology 2" edt.by Hadden,J.W., Chedid,L., Dukor,P., Spreafico,F., Willoughby,D., Pergamon Press Oxford:221
208. Salvin,S.B.
Younger,J.S.
Nishio,J.
Neta,R.
(1975) Brief communication: Tumor suppression by a lymphokine released into the circulation of mice with delayed hypersensitivity
J.Natl.Cancer Inst. 55:1233
209. Salvin,S.B.
Neta,R.
(1980) Patterns of in vivo release of lymphokines
Their enhancement and inhibition in "Biochemical characterization of lymphokines" edt.by de Weck,A.L., Kristensen,F., Landy,M., Acad.Press N.Y.:587
210. Samuelson,B.
(1983) The leukotrienes:
Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation
in "Advances in immunopharmacology 2" edt.by Hadden,J.W., Chedid,L., Dukor,P., Spreafico,F., Willoughby,D., Pergamon Press Oxford:527
211. Schmidt,M.E.
Douglas,S.D.
Rubin,A.
(1973) Human monocyte activation by supernatants from concanavalin A (Con A) stimulated lymphocytes
Cell.Immunol. 9:45

212. Schook, L.B.
Otz, V.
Lazary, S.
De Weck, A.L.
(1980)
Lymphokine activities in supernatants from human lymphoid cell lines
in "Biochemical characterization of lymphokines" ed. by de Weck, A.L., Kristensen, F., Landy, M., Acad. Press N.Y.:67
213. Schrader, J.W.
Clark-Lewis, I.
Bartlett, P.F.
(1982)
T cell hybridoma-derived lymphokines: Biology and biochemistry of factors regulating hemopoietic and lymphoid cells
Lymphokines 5:291
214. Schreiber, R.
Altmann, A.
Katz, D.H.
(1982)
Identification of a T cell hybridoma that produces large quantities of macrophage activating factor
J. Exp. Med. 156:677
215. Schultz, R.M.
Papamatheakis, J.D.
Chirigos, M.A.
(1977)
Interferon: An inducer of macrophage activation by polyanions
Science 197:674
216. Shacks, S.J.
Chiller, J.
Granger, G.A.
(1973)
Studies on in vitro models of cellular immunity:
The role of T and B cells in secretion of lymphotoxin
Cell. Immunol. 7:313
217. Shiozawa, C.
Singh, B.
Rubinstein, S.
Dieher, F.
(1977)
Molecular control of B cell triggering by antigen-specific T cell-derived helper factor
J. Immunol. 118:2199
218. Smith, A.K.
Lachman, L.B.
Oppenheim, J.J.
Favata, M.
(1980)
The functional relationship of the interleukins
J. Exp. Med. 151:1551
219. Smith, R.T.
Bansher, J.A.C.
Adler, W.H.
(1970)
Studies of an inhibitor of DNA-synthesis and a nonspecific mitogen elaborated by human lymphoblasts
Am. J. Pathol. 60:495
220. Sobel, A.T.
Branellec, A.
Blanc, C.
Lagrange, G.A.
(1977)
Physicochemical characterization of vascular permeability factor produced by con A-stimulated human lymphocytes
J. Immunol. 119:1230

221. Sonozaki, H.
Cohen, S.
(1971) The effect of sensitized lymphocytes on peritoneal exudate macrophages in the guinea pig
J.Immunol. 106:1404
222. Sorg, C.
(1977) Unspezifische Verstärkerreaktionen der Mediatoren zellulärer Immunität
Immunbiol. Suppl.2:64
223. Stadler, B.M.
Berenstein, E.H.
Siraganian, R.P.
Oppenheim, J.J.
(1982) Monoclonal antibody against human interleukin 2 (IL 2)
I. Purification of IL 2 for the production of monoclonal antibodies
J.Immunol. 128:1620
224. Stastny, P.
Ziff, M.
(1971) Macrophage migration inhibition and cytotoxicity in acute and chronic inflammation
in "Immunopathology of inflammation" ed.by Forscher, B.K. and Honck, J.C., Excerpta Med.Found. Amsterdam:66
225. Stastny, P.
Cooke, T.D.
Ziff, M.
(1973) Production of a macrophage migration inhibiting factor in rabbits with experimental arthritis
Clin.Exp.Immunol. 14:141
226. Stastny, P.
Rosenthal, M.
Andreis, M.
Ziff, M.
(1973) Lymphokines in the rheumatoid joint
Arthritis Rheum. 16:572
227. Sun, D.M.
Krumwich, D.
Lohmann-Matthes, M.
(1981) T cell hybridomas producing macrophage activating factor
Immunbiol. 160:120
228. Stewart, W.E., II.
(1983) Interferons: Immunopharmacological considerations
in "Advances in immunopharmacology 2" ed.by Hadden, J.W., Chedid, L., Dukor, P., Spreafico, F., Willoughby, D., Pergamon Press Oxford:137
229. Tada, T.
(1978) Antigen-specific T cell factors in "The pharmacology of immunoregulation" ed.by Werner, G.H. and Floc'h, F., Acad.Press London:173
230. Tappert, H.
(1981) Versuche zur Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren
Vet.Med.Diss. München

231. Taussig, M.J.
(1974) T cell factor which can replace
T cells in vivo
Nature (London) 248:234
232. Tubergen, D.G.
Feldman, J.D.
Pollock, E.M.
Lerner, R.A.
(1972) Production of macrophage inhibition
factor by continuous cell lines
J.Exp.Med. 135:255
233. Verheul, H.A.M.
Den Hollander, F.C.
Dijkhuizen, D.M.
Gijzen, J.W.L.
Kessels, J.G.M.
Schuurs, A.H.W.M.
(1982) Production and biological characteri-
zation of lymphoid cell line-
lymphokine (LCL-LK) preparations
in "Human Lymphokines" ed. by Khan, A.
and Hill, N.O., Acad.Press N.Y.:343
234. Vorlaender, K.O.
(1983) "Immunologie"
Thieme Verlag Stuttgart:829
235. Wahl, S.
Wahl, L.M.
Mergenhausen, S.E.
(1980) Lymphokine and monokine regulation
of fibroblast function
in "Biochemical characterization
of lymphokines" ed. by de Weck, A.L.,
Kristensen, F., Landy, M., Acad.Press
N.Y.:267
236. Waksman, B.H.
Namba, Y.
(1976) On soluble mediators of immunologic
regulation
Cell.Immunol. 21:161
237. Walker, S.M.
Lee, S.C.
Lucas, Z.J.
(1976) Cytotoxic activity of lymphocytes
VI. Heterogeneity of cytotoxins
in supernatants of mitogen-activated
lymphocytes
J.Immunol. 116:807
238. Waldmann, S.M.
Gottlieb, A.A.
(1973) Macrophage regulation of DNA-synthesis
in lymphoid cells:
Effects of a soluble factor from
macrophages
Cell.Immunol. 9:142
239. Ward, P.A.
Remold, H.G.
David, J.R.
(1969) Leukotactic factor produced by
sensitized lymphocytes
Science 163:1079
240. Ward, P.A.
Cohen, S.
Flanagan, T.
(1972) Leukotactic factors elaborated by
virus-infected tissues
J.Exp.Med. 135:1095

241. Ward, P.A. Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms
Dvorak, H.F. J.Immunol. 114:1523
Cohen, S.
Yoshida, T.
Data, R.
Selvaggio, S.S.
(1975)
242. Ward, P.A. Chemotaxis of rat lymphocytes
Unanue, E.R. J.Immunol. 119:416
Goralnick, S.J.
Schreiner, G.F.
(1977)
243. Watson, J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules
Gillis, S. I. Purification of a class of
Marbrook, J. murine lymphokines
Mochizuki, D. J.Exp.Med. 150:849
Smith, K.A.
(1979)
244. Watson, J. The biochemistry and biology of interleukin 2
Frank, M.B. Lymphokines 6:95
Mochizuki, D.
Gillis, S.
(1982)
245. Watson, J.D. Lymphokines and the induction of immune responses (overview)
(1981) Transpl. 31:313
246. Watson, J.D. Biology and biochemistry of T cell-derived lymphokines
(1983) I. The coordinate synthesis of interleukin 2 and colony-stimulating factors in a murine T cell lymphoma
J.Immunol. 131:293
247. Weck, de, A.L. The biology of the interleukins
Kristensen, F. in "Advances in immunopharmacology 2"
Bettens, F. edt.by Hadden, J.W., Chedid, L.,
Joncourt, F. Dukor, P., Spreafico, F., Willoughby, D.,
(1983) Pergamon Press Oxford:593
248. Weisbart, R.H. Migration enhancement factor,
Bluestone, R. a new lymphokine
Goldberg, L.S. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71:875
Pearson, C.M.
(1974)

249. Weisbart, R.H.
Chan, G.
Lusis, A.J.
Golde, D.W.
Billing, R.
Ashman, R.F.
(1982)
Neutrophil migration inhibition factor from T lymphocytes (NIF-T): Specific binding to human peripheral blood neutrophils and neutrophil precursors
in "Human Lymphokines" ed. by Khan, A. and Hill, N.O., Acad. Press N.Y.: 333
250. Welte, K.
Wang, C.Y.
Mertelsmann, R.
Venuta, S.
Feldman, S.
Moore, M.A.S.
(1982)
Purification of human interleukin 2 to apparent homogeneity and its molecular heterogeneity
J. Exp. Med. 156:454
251. Willoughby, D.A.
Spector, W.G.
Boughton, B.
(1964)
A lymph-node permeability factor in the tuberculin reaction
J. Pathol. Bacteriol. 87:353
252. Wilton, J.M.
Rosenstreich, D.L.
Oppenheim, J.J.
(1975)
Activation of guinea pig macrophages by bacterial lipopolysaccharide requires bone marrow-derived lymphocytes
J. Immunol. 114:388
253. Wood, D.D.
Cameron, P.M.
(1976)
Stimulation of release of a B cell-activating factor from human monocytes
Cell. Immunol. 21:133
254. Yamamoto, K.
Takahashi, Y.
(1971)
Macrophage migration inhibition by serum from desensitized animals previously sensitized with tubercle bacilli
Nature (London) 233:261
255. Yoshida, T.
Nagai, R.
Hashimoto, T.
(1973)
Lack of species specificity of a skin reactive factor released from sensitized guinea pig spleen cells
Lab. Invest. 29:329
256. Yoshida, T.
Sonozaki, H.
Cohen, S.
(1973)
The production of migration inhibiting factor by B and T cells of the guinea pig
J. Exp. Med. 138:784
257. Yoshida, T.
Cohen, S.
(1974)
Lymphokine activity in vivo in relation to circulation monocyte levels and delayed skin reactivity
J. Immunol. 112:1540

258. Yoshida,T.
Flanagan,T.D.
Genco,R.J.
Cohen,S.
(1974)
Virus-induced migration inhibitory
activity in experimental mumps
infection
Clin.Immunol.Immunopathol. 2:472
259. Yoshida,T.
Bigazzi,P.E.
Cohen,S.
(1975)
The production of anti-guinea pig
lymphokine antibody
J.Immunol. 114:688
260. Yoshida,T.
Edelson,R.
Cohen,S.
Green,I.
(1975)
Migration inhibitory activity in
serum and cell supernatants in
patients with Sezary syndrome
J.Immunol. 114:915
261. Yoshida,T.
Kuratsuji,T.
Takada,A.
Takada,Y.
Minowada,J.
Cohen,S.
(1976)
Lymphokine-like factors produced
by human lymphoid cell lines with
B or T cell surface markers
J.Immunol. 117:548
262. Yoshida,T.
Baba,T.
Suko,M.
Cohen,S.
(1980)
Studies on desensitization factors:
Suppressive effect on lymphokine
production
in "Biochemical characterization
of lymphokines" edt.by de Weck,A.L.,
Kristensen,F., Landy,M., Acad.Press
N.Y.:593
263. Zinsser,H.
Tamiya,T.
(1926)
An experimental analysis of
bacterial allergy
J.Exp.Med. 44:753

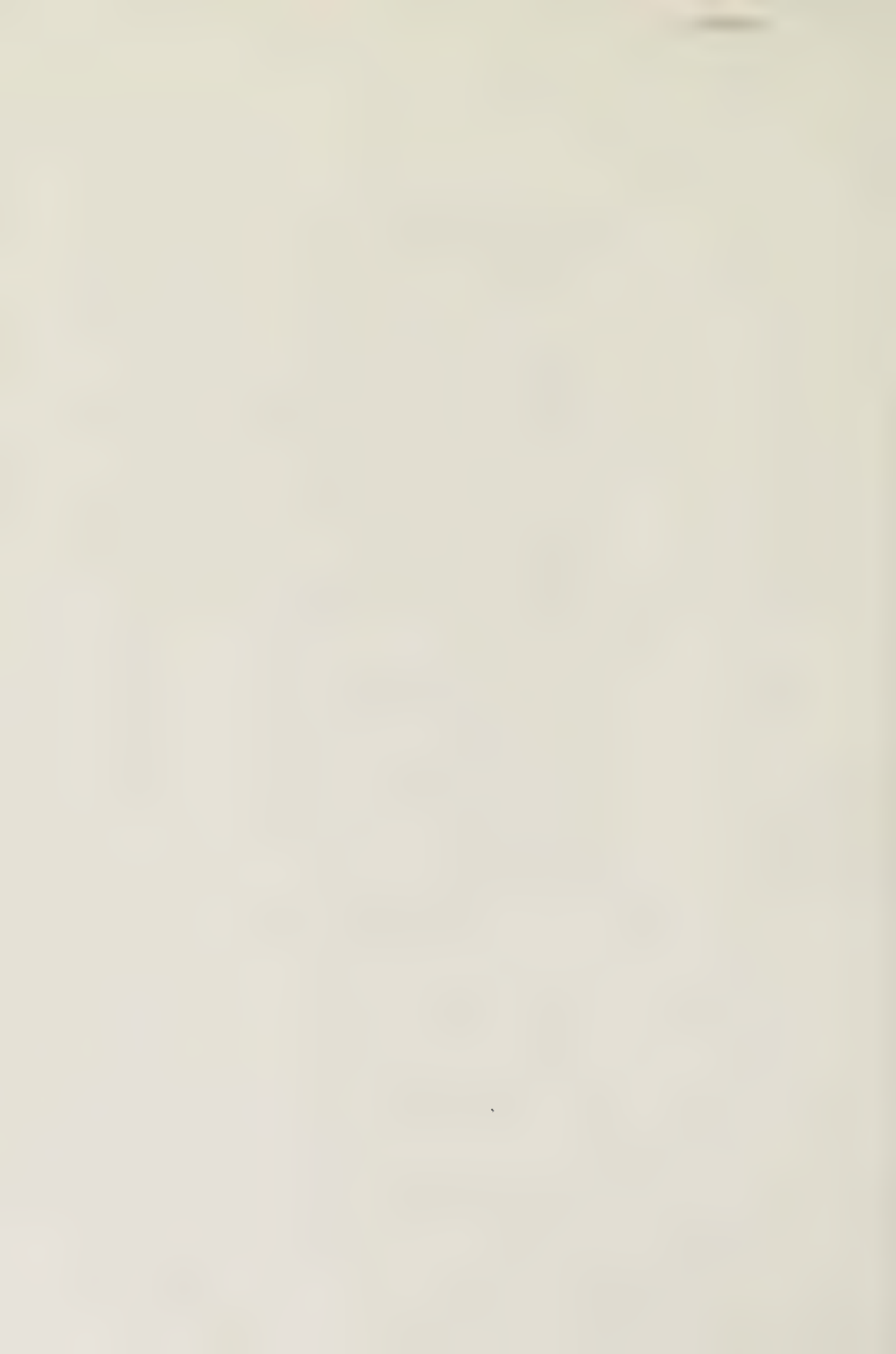
7. A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

A E F	Allogeneic effect factor
A G	Antigen
A I M	Antibody inhibitory material
A I S F	Antibody initiation suppressor factor
A L L	Acute lymphatic leukemia
A L K S	Antilymphokinserum
A M L	Acute myelotic leukemia
A K	Antikörper
A V	Aujeszky virus
B A F	B cell activating factor
B C A F	Basophil chemotaxis augmentation factor
B C F	Basophil chemotactic factor
B E L	Bovine embryonic lung
B E K	Bovine embryonic kidney
B L	Burkitt Lymphom
B - P L	Beta-Propiolacton
C	Complement
C I F	Cloning inhibitory factor
C F	Chemotactic factors
C K	Cytokin
C L	Cell line
C M I	Cell mediated immunity
C O N A	Concanavalin A
C P	Corynebacterium parvum
C P M	Counts per minute
C S F	Colony stimulating factor
C T F	Cytotoxic factor
C T L	Cytotoxic T lymphocyte
D T H	Delayed type hypersensitivity
E C F	Eosinophil chemotactic factor
E L I S A	Enzyme linked immunosorbent assay
E O - C S F	Eosinophil colony stimulating factor

E S P	Eosinophil stimulating promoter
E T A F	Epidermal cell thymocyte activating factor
F C S	Fetal calf serum
G M - C S F	Granulocyte-macrophage colony stim. factor
H C	Helper cells
H F	Helper factors
H P C S F	Histamin producing cell stimulating factor
H S V	Herpes simplex Virus
I D S	Inhibitory of DNA synthesis
I E	Internationale Einheit
I F N	Interferon
I G	Immunglobulin
I L	Interleukin
L A F	Lymphocyte activating factor
L C E F	Lymphocyte colony enhancing factor
L C I F	Lymphocyte colony inhibitory factor
L C F	Lymphocyte chemotactic factor
L C L - L K	Lymphoid cell line - lymphokine
L C P F	Lymphocyte colony promoting factor
L D	Letal dose
L D C F - F	Lymphocyte derived chemotactic f. f. fibrobl.
L I F	Leukocyte migration inhibitory factor
L K	Lymphokin
L M F	Lymphocyte mitogenic factor
L M W S	Low molecular weight suppressor
L N P F	Lymph node permeability factor
L P S	Lipopolysaccharid
L T	Lymphotoxin
M A F	Macrophage activating factor
M A g F	Macrophage aggregating factor
M C F	Macrophage chemotactic factor
M C G F	Mast cell growth factor
M C S	Monocyte complement stimulator
M D F	Macrophage dialyzable factor
M D F A F	Macrophage derived fibrobl. activ. factor

M D R	Macrophage disappearance reaction
M E F	Macrophage enhancing factor
M E M	Minimum essential medium
M F	Mitogenic factors
M G	Molekulargewicht
M I F	Macrophage migration inhibitory factor
M K	Monokin
M L R	Mixed leukocyte culture reaction
M L R - S F	Mixed leukocyte c.r. suppressor factor
M R	Maximal release
M S C	Mouse spleen cells
M St F	Migration stimulating factor
N A C L - P P	Natriumchlorid-Phosphatpuffer
N C F	Neutrophil chemotactic factor
N I F	Neutrophil immobilizing factor
N K	Natural killer
N S M	Non specific mediator
O A F	Osteoclast activating factor
P A F	Platelet aggregating factor
P B S	Phosphate buffered saline
P C S F	P cell stimulating factor
P F	Permeability factors
P H A	Phytohemagglutinin
P I	Phagozytose-Index
P I F	Proliferation inhibitory factor
P I N D	Paramunitätsinducer
P M A	Phorbol myristate acetat
P M N - M I F	Polymorphonuclear migration inhibitory factor
P P	Phagozytose-Prozentsatz
P P D	Purified protein derivative
P R T	Plaque-Reduktions-Test
P W M	Pokeweed mitogen
S C	Suppressor cells
S D H	Sorbit-Dehydrogenase
S E	Standard error

S E F	Soluble enhancing factor
S F	Suppressor factors
S L	Spezifische Lysis
S P A	Staphylokokken-Protein A
S R	Spontaneous release
S I	Stimulationsindex
S I R S	Soluble immune response suppressor
S K - S D	Streptokinase-Streptodornase
S M A F	Specific macrophage arming factor
S V	Sendai virus
T C G F	T cell growth factor
T C I D	Tissue culture infectious dose
T F	Transfer factor
T M F	Thymocyte mitogenic factor
T P F	Thymic permeability factor
T R	Test release
T R F	T cell replacing factor
T S F	Thymocyte stimulating factor
T T	Tetanus-Toxin
V P F	Vascular permeability factor
V S V	Vesicularis Stomatitis Virus
W E	Wirkungseinheit
W I	Wirkungsindex
Z K Ü	Zellkulturüberstand



L E B E N S L A U F

- 1956 Geboren am 11.Januar in Roding als 2.Sohn
 von Rudolf Reubel und seiner Ehefrau Herta
 Reubel, geb. Steinmetz
- 1962 Volksschule Roding
- 1966 St. Michaelsgymnasium der Benediktiner Metten,
 neusprachlicher Zweig
- 1975 Abitur
- Wehrdienst
- 1976 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
 Maximilians-Universität München
- 1981 Staatsexamen
- 1982 Approbation als Tierarzt
- Promotionsstudium am Institut für Medizinische
 Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät
 (Vorstand: Prof.Dr.DDr.h.c. Anton Mayr)
 Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit

Herrn Professor Dr. DDr. h.c. Anton Mayr danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seinen jederzeit gern gewährten Rat.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mathias Büttner für seine freundschaftliche und ständige Unterstützung.

